



# **Efeito da secagem nas propriedades biológicas e fração volátil de diversas espécies de cogumelos comestíveis**

**Ana Cândida Figueiredo da Silva**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Elsa Cristina Dantas Ramalhosa**

**Prof<sup>a</sup>. Doutora Paula Cristina dos Santos Baptista**

**Bragança  
2012**



O traballo que se presenta teve o apoio financeiro de:

Proxecto: *AGRINNDIF-"Mejora de la competitividad del sector agrario de Castilla y León y Norte de Portugal através de la innovación y el desarrollo de productos diferenciados de alto valor"*. POCTEP, 0452\_AGRINNDIF\_2\_E



UE  
FEDER  
Investimos no seu futuro

*À minha avó Augusta*

## **Agradecimentos**

Do ponto de vista académico a dissertação é um trabalho individual. Contudo, o contributo de algumas pessoas não pode ser deixado ao acaso, merecendo da minha parte um grande agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Elsa Ramalhosa, por todo o tempo que me dedicou, pelos enriquecedores conhecimentos que transmitiu nestes últimos dois anos, pela forma serena como resolveu todos os problemas que surgiram, pela constante ajuda e amizade.

De igual forma à Professora Doutora Paula Baptista que me colocou o desafio de desenvolver a dissertação neste âmbito, pela disponibilidade e amizade demonstrada.

Ao Professor. Doutor José Alberto Pereira, pela competência científica demonstrada e pelo inestimável apoio durante a parte laboratorial, assim como disponibilização de muito do equipamento utilizado.

Ao Professor Doutor Albino Bento, pelo esforço para garantir condições materiais e financeiras para o bom desenvolvimento do trabalho.

À Doutora Paula Guedes, do Serviço de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela disponibilidade do equipamento para a determinação dos compostos voláteis.

À Doutora Conceição Fernandes e Doutora Clementina Santos que com palavras de incentivo em muito contribuíram para a execução desta tese.

Ao Ricardo Malheiro pela ajuda prestada ao longo de todo o trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, especialmente na identificação dos compostos voláteis.

À Teresa, Maria João, Sylvia, e Micaela, pela amizade, compreensão e ternura sempre manifestadas, pelas alegrias e tristezas partilhadas, devo-vos muito.

Aos meus colegas de laboratório, Ana, Nuno, Hugo, Anabela, Ivo, Thays, Luana, Teresa, Fátima, Anabela Ferreira, pela boa disposição, pelo bom ambiente de trabalho proporcionado e ajuda constante na realização da parte experimental deste trabalho, e ainda de forma especial ao Eric que muito me ajudou na colheita dos cogumelos.

A todos os meus amigos, Ricardo, Telma, João Pedro, Paulo, Frederico, Esteves, Márcio, Zé Carlos, Dânia, Anita, André, Rita, Eduardo e aos demais que não mencionei por esquecimento, pelo constante incentivo, e por todos os momentos de diversão.

Às funcionárias do laboratório, Dona Isabel e de uma forma muito especial à Dona Céu, pela amizade, apoio prestado e convivência diária.

A toda a minha família, tios e primos pelo constante apoio que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos, em especial aos meus pais e irmão, pelo exemplo diário de responsabilidade e sentido de trabalho, sem dúvida um exemplo a seguir, espero assim compensar a falta de atenção e ausências.

## **Índice**

<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Cogumelos .....	2
1.2. Métodos de conservação de cogumelos .....	5
1.2.1. Secagem.....	7
1.3. Atividade antioxidante e compostos voláteis presentes nos cogumelos .....	11
1.3.1. Atividade antioxidante.....	11
1.3.2 Compostos voláteis .....	12
1.4. Objetivos do trabalho .....	14
<b>CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
2.1. Amostras.....	17
2.2. Tratamento das amostras e extrações realizadas.....	17
2.2.1. Extrações realizadas .....	17
2.2.2. Determinação da Capacidade Redutora Total .....	18
2.2.3. Atividade antioxidante .....	18
2.2.3.1. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) .....	18
2.2.3.2. Poder Redutor .....	19
2.2.4. Determinação dos Compostos Voláteis .....	19
2.2.4.1. Padrões utilizados .....	20
2.2.4.2. Extração dos compostos voláteis por Micro Extração em Fase Sólida (HS-SPME).....	20
2.2.4.3. Análise dos compostos voláteis por Cromatografia Gasosa (GC) - Espectrometria de Massa (MS) .....	21
2.3. Modelação do processo de secagem .....	22
2.3.1. Análise e modelação do processo de secagem .....	23
2.4. Tratamento estatístico.....	25
<b>CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
3.1. Rendimentos de extração .....	27

3.2. Capacidade Redutora Total.....	28
3.3. Atividade antioxidante.....	30
3.3.1. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) .....	30
3.3.2. Poder Redutor .....	33
3.4. Modelação do processo de secagem .....	35
3.5. Compostos voláteis .....	43
 <b>CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>49</b>
 <b>CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>



## **Resumo**

Os cogumelos silvestres comestíveis têm grande importância comercial devido ao seu valor nutricional e às suas características organolépticas e farmacológicas. De entre as espécies comestíveis mais frequentes nos pinhais em Portugal e valorizadas economicamente nos mercados internacionais destacam-se o *Lactarius deliciosus*, o *Boletus edulis* e o *Suillus luteus*. Por outro lado a espécie *Agaricus bisporus*, ao contrário das anteriores, é essencialmente obtida por cultura, a nível industrial, e é encontrada frequentemente em diversas superfícies comerciais. A maior parte dos cogumelos comestíveis silvestres e de cultura são comercializados em fresco. Contudo, por serem extremamente perecíveis, os cogumelos são vulgarmente submetidos a diversos métodos de conservação, sendo a secagem com ar quente um dos métodos mais antigos.

Desta forma o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da desidratação nas propriedades biológicas e fração volátil de diversas espécies de cogumelos comestíveis, silvestres e de cultura, bem como proceder à modelação do processo de secagem de algumas destas espécies. Para tal, procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante, usando dois métodos distintos, o efeito bloqueador de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e o poder redutor, bem como a capacidade redutora total de extratos metanólicos e de acetona, preparados a partir de amostras secas e frescas. Os voláteis foram extraídos e analisados por HS-SPME e GC-MS em amostras frescas de duas espécies de cogumelos. A modelação dos processos de secagem por convecção em ar quente de três espécies de cogumelos (*L. deliciosus*, *S. luteus* e *A. bisporus*) foi realizada às temperaturas de 35, 45 e 55 °C.

Os cogumelos secos apresentaram capacidade redutora total superior à dos frescos. O *A. bisporus* foi a espécie que se destacou, quer em fresco ( $1,01 \pm 0,09$  mg equivalentes de ácido gálico/g de matéria seca) como em seco ( $6,29 \pm 0,60$  mg equivalentes de ácido gálico /g de matéria seca) no caso do metanol. Já em relação à acetona, esta espécie de cogumelo apenas se evidenciou nas amostras frescas. Relativamente ao efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH, os cogumelos secos mostraram ter uma atividade antioxidante superior à dos frescos. Nos cogumelos secos o *S. luteus* foi a espécie que apresentou menores valores de  $EC_{50}$  ( $1,50 \pm 0,45$  mg matéria seca/mL – Acetona;  $1,92 \pm 0,35$  mg matéria seca/mL – Metanol), enquanto nos frescos foi o *B. edulis*. Resultados semelhantes foram obtidos no ensaio do poder redutor, sendo novamente o *S. luteus* a espécie que apresentou menores valores de  $EC_{50}$  quando analisados em seco ( $1,11 \pm 0,04$  mg matéria seca/mL – Acetona;  $3,00 \pm 0,72$  mg matéria seca/mL – Metanol). No caso das extrações metanólicas, o  $EC_{50}$  determinado para o *B. edulis* não foi significativamente diferente do anterior

( $2,80 \pm 0,28$  mg matéria seca/mL). No entanto, o cogumelo de cultura não apresentou uma atividade antioxidante distinta da determinada para as espécies silvestres.

Ao analisar os compostos voláteis presentes nos cogumelos *L. deliciosus* e *B. edulis* foram identificados 33 compostos, de onde se evidenciaram os compostos alifáticos com 8 átomos de carbono. Os compostos maioritários para as duas espécies analisadas foram a 3-octanona e o 3-octanol, respetivamente. Através do perfil dos voláteis foi possível distinguir as duas espécies de cogumelos.

Em relação ao processo de secagem, as curvas de secagem do *L. deliciosus* e *A. bisporus* foram semelhantes entre si, diferenciando-se das do *S. luteus*. Os modelos que melhor descreveram a secagem do *S. luteus* a 35, 45 e 55 °C foram o Logarítmico, Midilli e o *Two term exponential*, respetivamente. Em relação ao *L. deliciosus* o modelo *Two term exponential* mostrou ser o melhor a 35 e 55 °C, enquanto o de Newton se evidenciou dos restantes a 45 °C. No que diz respeito ao cogumelo de cultura, *A. bisporus*, o modelo que melhor descreveu a secagem foi novamente o de Newton a 35 e 45 °C, enquanto a 55 °C foi o *Diffusion Approach* que se destacou. As difusividades mássicas variaram entre  $6,06 \times 10^{-9}$  e  $1,83 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s, não se detetando diferenças entre os cogumelos silvestres e o de cultura.

## **Abstract**

Wild edible mushrooms have great commercial importance, as well as beneficial properties, linked to their nutritional value and their organoleptic and pharmacological characteristics. Among the most common edible mushroom species found in pine forests in Portugal, the *Lactarius deliciosus*, *Boletus edulis* and *Suillus luteus* have high economic value in international markets. Furthermore the *Agaricus bisporus* specie, unlike the previous ones, is essentially obtained by culture at industrial level, and is often found in many commercial shops. Most wild edible mushrooms are sold in fresh; however, they are extremely perishable. Thus, mushrooms are commonly subjected to various preservation methods, being the hot air drying one of the oldest.

In the present work it was intended to study the effect of dehydration in the volatile fraction and biological properties of several species of edible mushrooms, namely wild and of culture, as well as to carry out the modelling of the drying process of some of these species. To this end, the antioxidant activity was evaluated by two different methods, the blocking effect of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radicals (DPPH) and reducing power assays, as well as the total reducing capacity of extracts prepared in methanol and acetone. Fresh and dry samples were used. The volatiles were extracted and analyzed by HS-SPME and GC-MS in two fresh wild mushroom species. For the modelling of the drying process involving hot air convection at 35, 45 and 55 °C, three species of mushrooms (*L. deliciosus*, *S. luteus* and *A. bisporus*) were used.

The dried mushrooms showed higher total reducing capacity (TRC) than the fresh samples. *A. bisporus* species was the one with the highest TRC, both in fresh ( $1.01 \pm 0.09$  mg of GAE/g dry matter) and dry state ( $6.29 \pm 0.60$  mg of GAE/g dry matter) in methanol. Regarding acetone extractions, this mushroom specie showed the highest TRC only when analyzed in fresh state. For the blocking effect of DPPH free radicals, dried mushrooms showed higher antioxidant activity than the fresh ones. Among the dried mushrooms, *S. luteus* was the specie that showed the lowest EC<sub>50</sub> value ( $1.50 \pm 0.45$  mg dry matter/mL - Acetone,  $1.92 \pm 0.35$  mg dry matter/mL - Methanol), while in the fresh state it was the *B. edulis* specie that presented the lowest value. Similar results were obtained for the reducing power assay. *S. luteus* specie showed again the lowest EC<sub>50</sub> value when analyzed in dry state ( $1.11 \pm 0.04$  mg dry matter/mL - Acetone;  $3.00 \pm 0.72$  mg dry matter/mL - Methanol). In the case of methanolic extraction, the EC<sub>50</sub> determined for *B. edulis* was not significant different

from the previous one ( $2.80 \pm 0.28$  mg dry weight / ml). However, the culture mushrooms did not showed an antioxidant activity different to that found for the wild species.

Regarding the volatile compounds present in *L. deliciosus* and *B. edulis* mushrooms, 33 compounds were identified. Aliphatic compounds with 8 carbon atoms were the most common. For both mushrooms species the majority compounds were 3-octanone and 3-octanol, respectively. Through the volatiles profile it was possible to distinguish the two species of mushrooms.

Concerning the drying process, *L. deliciosus* and *A. bisporus* drying curves were similar, differing from *S. luteus*. The models that best described the drying of *S. luteus* at 35, 45 and 55 °C were the logarithmic, Midilli and Two-term exponential models, respectively. Regarding *L. deliciosus* the Two-term exponential model was the best at 35 and 55 °C, while the Newton was at 45 °C. With respect to the culture mushroom, *A. bisporus*, the model that best described the drying process was again the Newton model at 35 and 45 °C, while at 55 °C the Diffusion Approach Model was the best. Mass diffusivities varied between  $6.06 \times 10^{-9}$  and  $1.83 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s, not being detected significant differences between culture and wild mushrooms.

## **Índice de Figuras**

<b>Fig. 1</b> - Estrutura do basidiocarpo.....	<b>2</b>
<b>Fig. 2</b> - Espécies macrofúngicas estudadas. (A) <i>Lactarius deliciosus</i> ; (B) <i>Boletus edulis</i> ; (C) <i>Suillus luteus</i> ; (D) <i>Agaricus bisporus</i> .....	<b>4</b>
<b>Fig. 3</b> - Curva típica de secagem para um produto alimentar (Ordóñez, 2005).....	<b>9</b>
<b>Fig. 4</b> - Compostos aromáticos. (A) 1-octen-3-ol; (B) 2-octen-1-ol; (C) 3-octanol; (D) 1-octanol; (E) 3-octanona; (F) 1-octen-3-ona.....	<b>13</b>
<b>Fig. 5</b> - Preparação das amostras de cogumelos a utilizar nos ensaios de secagem.....	<b>22</b>
<b>Fig. 6</b> - Rendimentos de extração obtidos para os cogumelos secos sujeitos a extrações com metanol e acetona.....	<b>27</b>
<b>Fig. 7</b> - Capacidade redutora total obtida para os extratos preparados em metanol (A) e acetona (B).....	<b>28</b>
<b>Fig. 8</b> - Efeito bloqueador dos radicais livres DPPH (%) para extratos preparados com: (A) Cogumelos frescos em metanol; (B) Cogumelos frescos em acetona; (C) Cogumelos secos em metanol; e (D) Cogumelos secos em acetona.....	<b>31</b>
<b>Fig. 9</b> - EC50, expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do efeito bloqueador do DPPH para as extrações realizadas em metanol (A) e acetona (B).....	<b>32</b>
<b>Fig. 10</b> - Poder redutor de extratos preparados com: (A) Cogumelos frescos em metanol; (B) Cogumelos frescos em acetona; (C) Cogumelos secos em metanol; (D) Cogumelos secos em acetona.....	<b>33</b>
<b>Fig. 11</b> - Valores de EC50, expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do Poder Redutos para os extratos preparados a partir de metanol (A) e acetona(B).....	<b>34</b>
<b>Fig. 12</b> - Curvas de secagem do (A) <i>S. luteus</i> , (B) <i>L. deliciosus</i> , e (C) <i>A. bisporus</i> .....	<b>35</b>
<b>Fig. 13</b> - Velocidades de secagem em função do tempo para o (A) <i>S. luteus</i> , (B) <i>L. deliciosus</i> , e (C) <i>A. bisporus</i> .....	<b>40</b>
<b>Fig. 14</b> - Ln <i>mr</i> em função do tempo de secagem para o (A) <i>S. luteus</i> , (B) <i>L. deliciosus</i> e (C) <i>A. bisporus</i> , às temperaturas de 35, 45 e 55 °C.....	<b>42</b>
<b>Fig. 15</b> - Perfil cromatográfico obtido a partir das duas espécies de cogumelos silvestres analisadas por HS-SPME utilizando fibra divinilbenzeno/PDMS e GC/MS (os números de identificação correspondem aos compostos apresentados na Tabela 8).....	<b>45</b>

**Fig. 16** - Soma das áreas (unidades arbitrárias/1000) das diferentes classes químicas identificadas (Álcoois, Aldeídos, Ésteres, Cetonas; Sesquiterpenos e Terpenos) nas duas espécies de cogumelos silvestres.....**46**

**Fig. 17** - Análise das componentes principais obtidas a partir dos dados do perfil de voláteis (classes químicas) determinados por HS-SPME e GC/MS das duas espécies de cogumelos silvestres. Os fatores PCA explicam 87,2% da variância total.....**48**

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1-</b> Vários modelos matemáticos usados na modelação da secagem.....	<b>8</b>
<b>Tabela 2-</b> Estudos de secagem realizados com cogumelos.....	<b>10</b>
<b>Tabela 3-</b> Capacidade redutora total (mg eq ácido gálico/g de matéria seca ou mg eq $\alpha$ -tocoferol/g de matéria seca) dos diferentes extratos de cogumelos preparados com metanol e acetona.....	<b>29</b>
<b>Tabela 4-</b> DPPH (EC <sub>50</sub> ) (mg matéria seca/mL) dos diferentes extratos de cogumelos obtidos por diferentes solventes.....	<b>32</b>
<b>Tabela 5-</b> Valores de EC <sub>50</sub> , expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do Poder Redutor para os extratos preparados a partir de metanol e acetona, envolvendo cogumelos secos e frescos.....	<b>34</b>
<b>Tabela 6-</b> Análise estatística aos modelos aplicados aos dados experimentais obtidos durante a secagem das três espécies de cogumelos às temperaturas de 35, 45 e 55 °C.....	<b>37</b>
<b>Tabela 7-</b> Difusividades mássicas de vapor de água calculadas para as três espécies de cogumelos estudadas no presente trabalho e sujeitas a secagem por convecção com ar quente a 35, 45 e 55 °C.....	<b>42</b>
<b>Tabela 8-</b> Perfil em compostos voláteis de duas espécies de cogumelos, <i>Boletus edulis</i> e <i>Lactarius deliciosus</i> , analisados em fresco no presente trabalho (média $\pm$ desvio padrão; n = 3).....	<b>44</b>
<b>Tabela 9-</b> Perfil dos compostos voláteis de <i>Boletus edulis</i> desidratado (Fonte: Pinho <i>et al.</i> , 2008).....	<b>49</b>

## ***Capítulo I***

### ***Introdução e Objetivos do Trabalho***



## 1.1. Cogumelos

Os cogumelos, muitas vezes designados por carpóforos, são fungos superiores pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (Kirk *et al.*, 2011). As espécies de fungos que apresentam este tipo de estrutura, mesmo pertencendo a grupos taxonómicos distintos, são classificadas como macrofungos (Baptista, 2007).

As espécies de cogumelos mais conhecidos e comuns pertencem à subclasse Agaricomycetidae Parmasto (Baptista, 2007). Os corpos de frutificação da maioria dos macrofungos incluídos nesta subclasse caracterizam-se por serem compostos pelo pé (ou estipe), onde podem existir a volva, anel ou cortina, e pelo chapéu (ou píleo) que apresenta na parte inferior o himénio (Figura 1).



Fig. 1 - Estrutura do basidiocarpo

São conhecidas aproximadamente 2 000 espécies de cogumelos comestíveis. Todavia, apenas 25 são normalmente utilizadas na alimentação humana e um número ainda menor é comercialmente cultivado (Coutinho, 2004). Os cogumelos comestíveis têm grande importância comercial devido ao seu elevado valor nutricional e às suas excelentes características organoléticas (sabor, odor e textura) (Ribeiro *et al.*, 2008). São ricos em proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais e apresentam baixos níveis calóricos e lipídicos

tornando-os alimentos ideais em dietas de emagrecimento (Sadler, 2003). Além do seu interesse nutricional, os cogumelos são também importantes na área da medicina. Caracterizam-se por possuírem elevadas atividades antioxidante e antimicrobiana, podendo ser ainda utilizados para baixar o colesterol (lipoproteína de baixa densidade – LDL), inibir o desenvolvimento de tumores e funcionar como imunomoduladores. Vários estudos já foram realizados neste âmbito, tais como os publicados por Barros *et al.* (2008), Ferreira *et al.* (2009) e Vaz *et al.* (2010). Certos compostos bioativos foram inclusivamente já isolados e posteriormente produzidos industrialmente. Como exemplo destacam-se o *Lentinan* e o *Schizophyllan*, dois polissacáridos ( $\beta$ -glucanos) com propriedades anti-tumorais utilizados em tratamentos de quimioterapia para o cancro do estômago e do colo do útero, respetivamente (Smith *et al.*, 2002).

De entre as diversas espécies macrofúngicas comestíveis, as espécies saprófitas são as que se comercializam em maior quantidade devido essencialmente à sua facilidade de cultura. Neste âmbito destacam-se o *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach (Figura 2), várias espécies do género *Pleurotus* e a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler por serem as espécies com um maior volume de produção a nível mundial (FAO, 2010). A primeira espécie é a mais cultivada e consumida em todo o mundo, contribuindo em cerca de 40% da produção mundial (Giri & Prasad, 2007). O crescimento rápido destas espécies associado ao baixo custo de cultura, permite um rápido retorno do investimento inicial, o que é visto por muitos como uma boa fonte de rendimentos. Estima-se que podem ser atingidos elevados lucros (superior a 100%) sobre o capital investido no final do ciclo de cultura, percentagem que pode variar em função do sistema utilizado (Poppe, 2000). Contudo, é no grupo dos macrofungos micorrízicos que se encontram as espécies mais valorizadas, devido à dificuldade da sua obtenção por cultura. Estas espécies associam-se exclusivamente com espécies lenhosas e surgem somente em bosques, florestas e povoamentos agro-florestais. Apesar de já se terem feito alguns esforços no âmbito do cultivo de cogumelos micorrízicos, o sucesso final tem sido muito reduzido (Wang & Hall, 2004). De entre as espécies micorrízicas mais valorizadas destacam-se a *Tuber magnatum* Picco, mais conhecida como trufa branca italiana, cujos preços de venda podem variar entre 1 500 e 17 500 €/kg, a *Tuber melanosporum* Vittad. também designada por trufa negra de Périgord, com preços a variar entre os 500 e os 1 750 €/kg, a *Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer 350 a 1 250 €/kg, e as espécies *Boletus edulis* Bull., *Lactarius deliciosus* (L.) Gray e *Suillus luteus* (L.) Roussel, cujos preços são mais acessíveis na ordem dos 6-15 €/kg (Baptista, 2007; Wang & Hall, 2004).

Estas três últimas espécies aparecem vulgarmente no nordeste Transmontano, sendo uma das mais importantes a nível comercial nesta região. A colheita e o consumo de cogumelos silvestres são práticas tradicionais em Trás-os-Montes. À semelhança do resto da Europa, a colheita nesta zona de cogumelos silvestres com objetivo comercial aumentou nos últimos anos devido à maior procura e valorização deste produto no mercado nacional e internacional (ICN, 2001).



(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 2 - Espécies macrofúngicas estudadas. (A) *Lactarius deliciosus*; (B) *Boletus edulis*; (C) *Suillus luteus*; (D) *Agaricus bisporus*.

Morfologicamente, o *L. deliciosus* (Figura 2A) caracteriza-se por apresentar uma cor alaranjada com ligeiras tonalidades verdes. Quando cortado, produz um látex e intensifica-se a cor verde. O tamanho varia entre 5-13 cm. Surge especialmente em pinhais durante o

outono. O *B. edulis* (Figura 2B) possui uma cor castanho avermelhada e pode atingir dimensões superiores ao anterior, podendo mesmo atingir os 3 Kg e os 34 cm de diâmetro. Esta espécie, apesar de frutificar maioritariamente no outono, também pode surgir durante a primavera em diversos habitats como soutos, pinhais, carvalhais, entre outros. O *S. luteus* (Figura 2C) caracteriza-se por possuir um chapéu tipicamente castanho, e pelo facto de ficar viscoso em contacto com a água. Possui um diâmetro de aproximadamente 12 cm, e uma cutícula que o reveste que é facilmente removida. Frutifica especialmente no outono, sobretudo em pinhais. Em termos de sabor, o *S. luteus* é menos apreciado que o *B. edulis*. Contudo, embora o *S. luteus* apresente uma cor semelhante ao *B. edulis*, o primeiro mantém a mesma após uma breve cozedura, sendo uma vantagem em termos comerciais.

A curta vida de prateleira dos cogumelos constitui um obstáculo para a distribuição e comercialização do produto fresco. Deste modo, a conservação deste tipo de produtos, com preservação da sua qualidade, surge como uma alternativa com benefícios, quer para a indústria de cogumelos, quer para os consumidores. Através da conservação é possível comercializar este tipo de produtos durante todo o ano. No caso dos cogumelos micorrízicos este aspeto tem contornos mais importantes por se tratar de um produto sazonal. De facto, a dificuldade de cultura de espécies micorrízicas faz com que a sua comercialização em fresco ocorra apenas nas épocas de frutificação (outono e esporadicamente na primavera).

## **1.2. Métodos de conservação de cogumelos**

Em Portugal, como no resto do mundo, os cogumelos são consumidos de diversas formas. No que respeita à região de Trás-os-Montes, o uso de cogumelos em fresco é uma prática comum, principalmente nas épocas quando estes existem em maior quantidade, normalmente no início da primavera e do outono. O consumo sazonal de cogumelos frescos (em especial dos micorrízicos) deve-se à sua elevada perecibilidade. Mesmo quando colhidos nas melhores condições, se mantidos à temperatura ambiente apenas permanecem aceitáveis para consumo cerca de 36 horas. As causas desta perecibilidade são várias, destacando-se: *i*) a fragilidade da estrutura dos cogumelos que, por serem facilmente danificados, permite a libertação de água e nutrientes do interior das hifas (unidade estrutural do fungo que no seu conjunto forma o micélio); *ii*) a existência de um valor de pH neutro (6-7) associado a elevados níveis de humidade (>90%) favorecem o crescimento de microrganismos e a sua atividade enzimática; *iii*) possuem uma variada gama de nutrientes como açúcares, péptidos e aminoácidos, vitaminas e minerais que favorecem ainda mais o desenvolvimento microbiano; *iv*) a elevada

taxa respiratória (superior ao dos vegetais) incrementa a perda de água, textura e de nutrientes dos carpóforos; v) algumas espécies (e.g. género *Agaricus*) possuem enzimas, como as polifenoloxidasas responsáveis pelo escurecimento dos tecidos superficiais dos carpóforos; e vi) por sua vez, outras espécies como as do género *Lactarius*, produzem substâncias leitosas pigmentadas muito sensíveis à oxidação, responsáveis pela alteração de cor dos carpóforos (Burton & Twynning, 1989; Blanco *et al.*, 2011). Os sinais de deterioração dos cogumelos manifestam-se pela desidratação, perda de rigidez dos tecidos, escurecimento enzimático e/ou lesões bacterianas, bem como por alterações no sabor e no aroma, o que conduz à diminuição da qualidade e valor comercial do produto (Gormley, 1975). Este facto constitui um problema para a distribuição, uma vez que obriga a circuitos rápidos, com refrigeração constante, exigindo a definição de um método de conservação adequado. Assim, e dada a tendência atual de existir um cada vez maior número de espécies de cogumelos a serem comercializados, o processamento e conservação são fatores determinantes para o sucesso do produto. Os processos de conservação têm como objetivo evitar as alterações nos alimentos, sejam elas de origem microbiana, enzimática, física ou química. A tecnologia de conservação de alimentos consiste na aplicação de processos físicos ou químicos, tais como o uso de altas e baixas temperaturas, desidratação, adição de substâncias químicas, uso de radiação, etc. Nos últimos anos a exigência dos consumidores tem aumentado, pois cada vez mais se fala na qualidade e na segurança dos alimentos, daí que produtos que conservem as suas características originais são preferidos pelos consumidores.

Os cogumelos são vulgarmente submetidos a diversos métodos de conservação, sendo a congelação, desidratação e esterilização os mais vulgares.

O congelamento continua a ser um dos mais versáteis métodos de conservação de grandes quantidades de cogumelos, especialmente aqueles que requerem tratamento rápido ou delicado, como por exemplo, o *S. luteus*. Este método requer, contudo, que os cogumelos sejam previamente tratados em água a ferver, para evitar que escureçam no momento do descongelamento. A secagem de cogumelos é também um dos melhores métodos de conservação, pois é muito utilizada para aumentar a longevidade de produtos com elevado teor em água (Shukla & Singh, 2007). Contudo, a elevada sensibilidade dos cogumelos à temperatura faz da escolha de um método de secagem uma decisão muito importante. A secagem preserva os cogumelos por períodos de tempo muito longos, com pouca ou nenhuma deterioração no sabor ou qualidade. Em algumas espécies, como por exemplo o *B. edulis*, pode até mesmo intensificar o sabor. Os cogumelos são assim armazenados de forma prática

e fácil, sem necessidade de equipamento especial. Verifica-se também que as indústrias usam cada vez mais produtos secos na produção de alimentos instantâneos, sendo os cogumelos muito utilizados, por exemplo, em sopas.

Além da congelação e secagem, a esterilização é outro modo de conservação muito utilizado à escala industrial, tendo, contudo, o inconveniente de ser uma técnica muito dispendiosa. Neste caso, os cogumelos são geralmente comercializados em latas e frascos de vidro hermeticamente fechados. O *A. bisporus* ou champignon, como é vulgarmente designado, é vendido nesta forma (cogumelos inteiros ou laminados) em grande escala em todo o mundo.

Uma vez que no presente trabalho se pretendeu estudar a secagem de cogumelos silvestres recolhidos na zona do Nordeste Transmontano, na seção seguinte abordar-se-á em mais pormenor esta tecnologia.

#### 1.2.1. Secagem

O objetivo de qualquer processo de conservação de alimentos é a manutenção da qualidade do produto (Brod, 2003). A secagem é uma das mais antigas e usuais operações de desidratação, usada na indústria alimentar. É também uma das operações mais complexas, devido aos processos de transferência de calor e de massa envolvidos (Menon & Mujumdar, 1987). O principal objetivo da secagem de alimentos é garantir a sua conservação e assegurar uma redução do teor de água até ao nível a partir do qual as concentrações de açúcares, sais, ácidos e outros componentes sejam suficientemente altas para reduzir a atividade da água, impedindo assim o crescimento de microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos (Travaglini *et al.*, 1993).

Existem inúmeras razões para se realizar a secagem de cogumelos, tais como, diminuição do peso (diminuindo assim os custos no transporte), diminuição da energia gasta por não necessitar de refrigeração e possibilitar uma fácil acessibilidade ao produto durante qualquer época do ano.

Em relação ao processo de secagem, durante a desidratação o movimento da água do interior do cogumelo até à sua superfície segue as leis que regem a transferência de massa. Para que haja a evaporação de água da superfície do cogumelo para o ambiente, a água deve ser transportada do interior do sólido até à sua superfície. Os produtos alimentares podem ceder ou absorver humidade ao/do ar circundante, dependendo da humidade relativa do meio de aquecimento. Quando os cogumelos estão a uma dada temperatura, a humidade contida nos



mesmos tende a igualar a humidade relativa do meio circundante. Ou seja, atingir-se-á o equilíbrio quando a pressão de vapor de água da superfície do cogumelo igualar a pressão de vapor do meio ambiente. As condições de secagem variam com as propriedades do ar de secagem e a forma como se faz o contacto do ar com o produto.

Na literatura estão publicados vários modelos matemáticos que tentam modelar o processo de secagem. Alguns são modelos matemáticos baseados na teoria de difusão clássica e de formas simplificadas destes, enquanto outros são modelos puramente empíricos. Alguns dos modelos mais utilizados para descrever o processo de secagem de alimentos encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Vários modelos matemáticos usados na modelação da secagem.

Modelo	Equação	Referência
Diffusion Approach	$mr = a \times e^{-kt} + (1 - a) \times e^{-kbt}$	Cihan <i>et al.</i> (2007)
Newton	$mr = e^{-kt}$	O' Callaghan <i>et al.</i> (1971)
Page	$mr = e^{-kt^n}$	Page (1949)
Henderson e Pabis	$mr = a \times e^{-kt}$	Henderson & Pabis(1961)
Two-term exponential	$mr = a \times e^{-kt} + (1 - a) \times e^{-kat}$	Togrul (2005)
Logarítmico	$mr = a_0 + a \times e^{-kt}$	Cihan <i>et al.</i> (2007)
Midilli	$mr = a \times e^{-kt^n} + bt$	Midilli <i>et al.</i> (2002)
Two-term	$mr = a_1 \times e^{-k_1t} + a_2e^{k_2t}$	Sharaf-Eldeen <i>et al.</i> (1980)

Nestes modelos o  $mr$  corresponde ao rácio de humidade, sendo ( $w$ ) o teor de humidade instantânea do cogumelo, expresso em g água/g matéria seca,  $w_0$  o teor de humidade inicial e o  $w_e$  o teor de humidade de equilíbrio. O  $mr$  foi calculado através da seguinte equação:

$$mr = \frac{w-w_e}{w_0-w_e} \text{ (Equação 1)}$$

Na secagem de alimentos pode existir um período de velocidade de secagem constante, seguido de um ou mais períodos de velocidade decrescente. Na Figura 3 encontra-se representada uma curva de secagem para um produto alimentar, onde se pode observar estes dois períodos de secagem.

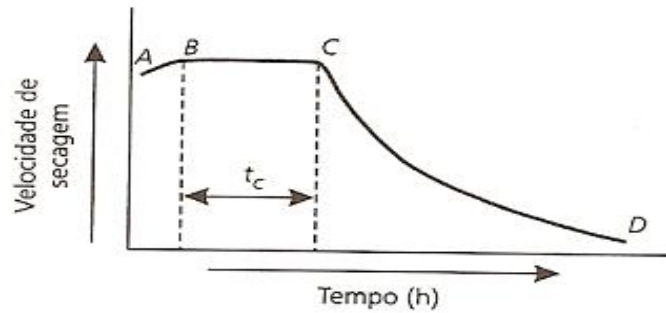


Fig. 3 - Curva típica de secagem para um produto alimentar (Ordóñez, 2005).

Em mais pormenor, o Período A-B corresponde a um período de estabilização, onde se atinge o equilíbrio entre a superfície do produto e o ar de aquecimento, sendo geralmente desprezável. A zona B-C corresponde ao período de velocidade de secagem constante durante o qual a superfície do produto encontra-se saturada com água líquida, mantendo-se a temperatura da superfície constante. A zona C-D corresponde ao período de velocidade decrescente, diminuindo a pressão de vapor à superfície e constitui geralmente o período de tempo mais significativo. Desse modo os períodos de velocidade de secagem decrescente são, quase sempre, os únicos observados na secagem de produtos alimentares.

Os estudos de secagem, além de dar a conhecer o comportamento de um dado produto alimentar ao longo do processo de desidratação, também permitem calcular uma propriedade importante dos alimentos, designadamente a difusividade mássica. Neste sentido, a equação da 2ª Lei de Fick, referente à transferência de massa no estado não estacionário é geralmente aplicada. A 2ª Lei de Fick para sólidos de forma aplainada, considerando a resistência externa desprezável, é expressa pela seguinte equação, onde  $D$  = Difusividade mássica e  $L$  = espessura:

$$\frac{w-w_e}{w_0-w_e} = \frac{8}{\pi^2} \left[ e^{-\frac{\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} + \frac{1}{9} e^{-\frac{9\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} + \frac{1}{25} e^{-\frac{25\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} \dots \dots \right] \quad \text{Equação 2}$$

Na literatura foram encontrados alguns estudos sobre secagem de cogumelos, estando os modelos e os valores de difusividade mássica referidos nesses trabalhos descritos na Tabela 2.



Tabela 2 - Estudos de secagem realizados com cogumelos.

Referência	Cogumelo	Modelo de secagem mais adequado	Difusividade mássica ( $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ )
Celen <i>et al.</i> , 2010	<i>A. bisporus</i>	Diffusion approach	-
Tulek, 2011	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.)	Midilli	$6,62 \times 10^{-10}$ a $1,56 \times 10^{-9}$ (50, 60 e 70 °C)
Wakchaure & Mahantesh, 2010	<i>A. bisporus</i>	Logarítmico	$9,21 \times 10^{-8}$ a $1,49 \times 10^{-7}$ (45, 55 e 65 °C)

Verificou-se que em todos os estudos até ao momento publicados, apenas foram estudados cogumelos de cultura. No primeiro caso apresentado apenas foi feita a modelação do processo de secagem, com apresentação dos melhores modelos obtidos. Nos restantes estudos calcularam-se ainda os valores de difusividade mássica. Refira-se que em nenhum dos estudos foram calculadas as velocidades de secagem.

O efeito da secagem na qualidade dos cogumelos tem sido pouco estudado pela comunidade científica. A maioria dos estudos efetuados neste âmbito avalia apenas o efeito de diferentes técnicas de secagem no sabor e cor, na composição nutricional e na capacidade de reidratação dos cogumelos (Naik *et al.*, 2006; Kulshreshtha *et al.*, 2009; Argyropoulos *et al.*, 2011; Muyanjanja *et al.*, 2012). Estudos que avaliem o efeito da secagem ao nível das propriedades biológicas e da fração volátil dos cogumelos são praticamente inexistentes. Somente Hongfang *et al.* (2012) avaliaram recentemente o efeito de diferentes métodos de secagem (secagem ao sol, ar quente, microondas a vácuo e liofilização) sobre as propriedades antioxidantes e a composição fenólica de *A. bisporus*, tendo verificado ser o método de secagem por microondas a vácuo o mais adequado. Resultados semelhantes foram obtidos por Ma *et al.* (2011) ao verificarem que os diferentes processos de secagem testados (liofilização, ar quente, vácuo) influenciavam significativamente as propriedades antioxidantes de polissacarídeos da espécie *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát. Dado o reduzido número de estudos neste âmbito e por se tratar de um dos objetivos do presente estudo, na seção seguinte abordar-se-á em mais pormenor a atividade antioxidante e a composição em voláteis dos cogumelos.

### **1.3. Atividade antioxidante e compostos voláteis presentes nos cogumelos**

#### **1.3.1. Atividade antioxidante**

Nos últimos anos, a toxicidade de alguns compostos sintéticos que têm sido utilizados nos alimentos como antioxidantes tem sido posta em causa, tendo despertado o interesse pela procura de produtos naturais (Fukushima & Tsuda, 1985; Stone *et al.*, 2003). Algumas indústrias alimentares, relacionadas com a produção de aditivos, além das farmacêuticas e de cosméticos, têm aumentado os seus esforços na preparação de compostos bioativos a partir de produtos naturais por extração e purificação.

A procura de novos produtos com propriedades antioxidantes aumentou consideravelmente. Sabe-se que os compostos antioxidantes podem capturar radicais livres, aumentando assim a vida de prateleira dos produtos, uma vez que, por exemplo, retardam o processo de peroxidação lipídica que afeta principalmente a cor, textura, sabor e valor nutricional, sendo uma das principais razões para a deterioração dos produtos alimentares durante o seu processamento e armazenamento (Halliwell, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Tanto os legumes como as frutas são excelentes fontes de antioxidantes. São exemplos de compostos com atividade antioxidante a vitamina A, vitamina C, vitamina E, carotenóides, compostos fenólicos e os flavonóides (Diplock *et al.*, 1998), substâncias capazes de reduzir o risco de doenças crónicas. Nessa perspetiva os antioxidantes presentes na dieta alimentar assumem uma grande importância, como possíveis agentes protetores, que reduzem os danos oxidativos no corpo humano. Visto isto, o consumo de antioxidantes a partir destas fontes na alimentação é benéfico na prevenção de doenças cardiovasculares e degenerativas, especialmente a aterosclerose (Hu, 2000). Os polifenóis também pertencem à categoria dos fitoquímicos e são os antioxidantes mais abundantes da nossa dieta (Visioli *et al.*, 2002).

Os cogumelos são muito utilizados na alimentação e na produção de medicamentos, principalmente na Ásia (Chang, 1996). Alguns dos cogumelos comestíveis consumidos no continente asiático têm sido pesquisados e demonstram possuir atividade antioxidante, o que está correlacionada com o seu conteúdo em fenóis (Yen & Hung, 2000; Yang *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 2003; Huang & Chen, 2004; Cheung & Cheung, 2005; Lo & Cheung, 2005).

Diversos estudos sobre a atividade antioxidante de algumas espécies de cogumelos comestíveis silvestres foram já realizados, designadamente do *L. deliciosus*, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *B. edulis*, *Leccinum scabrum* (Bull.) Gray (Keles *et al.*, 2011),

*Leucopaxillus giganteus* (Quél.) Singer, *Sarcodon imbricatus* L., *Agaricus arvensis* Schaeff., (Barros *et al.*, 2007), *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler e *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer (Cheung *et al.*, 2003).

Importa ainda referir que os estudos mencionados foram realizados em cogumelos secos ou liofilizados, não tendo sido encontrado nenhum estudo em cogumelos frescos até ao momento.

Em relação aos métodos que vêm sendo utilizados na avaliação da atividade antioxidante, importa referir o método do  $\beta$ -caroteno, efeito bloqueador dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ensaio de hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres de peróxido, poder redutor, entre outros.

### 1.3.2 Compostos voláteis

Os cogumelos devido à sua grande diversidade possuem diversos aromas, o que como já foi mencionado, os torna atraentes do ponto de vista gastronómico. Os diversos aromas presentes resultam da presença de muitos compostos voláteis, sobretudo, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e terpenos (Pinho *et al.*, 2008).

Alguns compostos proporcionam aromas agradáveis, tais como, a amêndoa (algumas espécies dos género *Agaricus* e *Hygrophorus*), anis (algumas espécies dos género *Agaricus* e *Clitocybe*), farinha (típico das espécies *Calocybe gambosa* (Fr.) Donk e *Clitopilus prunulus* (Scop.) P. Kumm.) e ainda aromas florais ou frutados (abacaxi, limão ou laranja, entre outros) (Jong & Birmingham, 1993). Muitas vezes estes aromas tão diversificados são utilizados na identificação de espécies de cogumelos através da análise sensorial (Courtecuisse, 1999; Courtecuisse & Duhem, 2005). Como exemplo da utilização de compostos voláteis no contexto quimiotaxonómico, temos o trabalho de Berger *et al.* (1986) e de Pinho *et al.* (2008) em que os autores traçaram o perfil de voláteis de várias espécies macrofúngicas e cujo resultado foi a identificação de padrões distintos para cada espécie. A procura de substâncias que, na sua forma pura, apresentem aroma assume grande importância para a bioindústria, em especial para as indústrias alimentar e cosmética. Uma vez que, os cogumelos apresentam compostos aromáticos desejáveis, eles têm grandes potencialidades para serem explorados neste âmbito. Comparativamente às plantas, os cogumelos têm sido pouco explorados para a produção industrial de compostos aromáticos naturais.

A composição em voláteis pode variar, dependendo da/o: i) espécie (Pinho *et al.*, 2008); ii) parte do cogumelo usado (píleo, estipe) (Noël-Suberville *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2008); iii) grau de maturação (Mau *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007); e iv) ecossistema em que estão inseridos (Baptista *et al.*, 2010).

Normalmente os principais compostos aromáticos presentes nos cogumelos são aqueles que contêm oito átomos de carbono, tais como, o 1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 3-octanol, 1-octanol, 1-octen-3-ona e 3-octanona (Beltran-Garcia *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 2008). De acordo com Combet *et al.* (2006), estes compostos podem variar entre 44,3 e 97,6% da fração volátil total, dependendo das espécies de cogumelos. Na Figura 4 estão representadas as fórmulas de estrutura destes compostos.

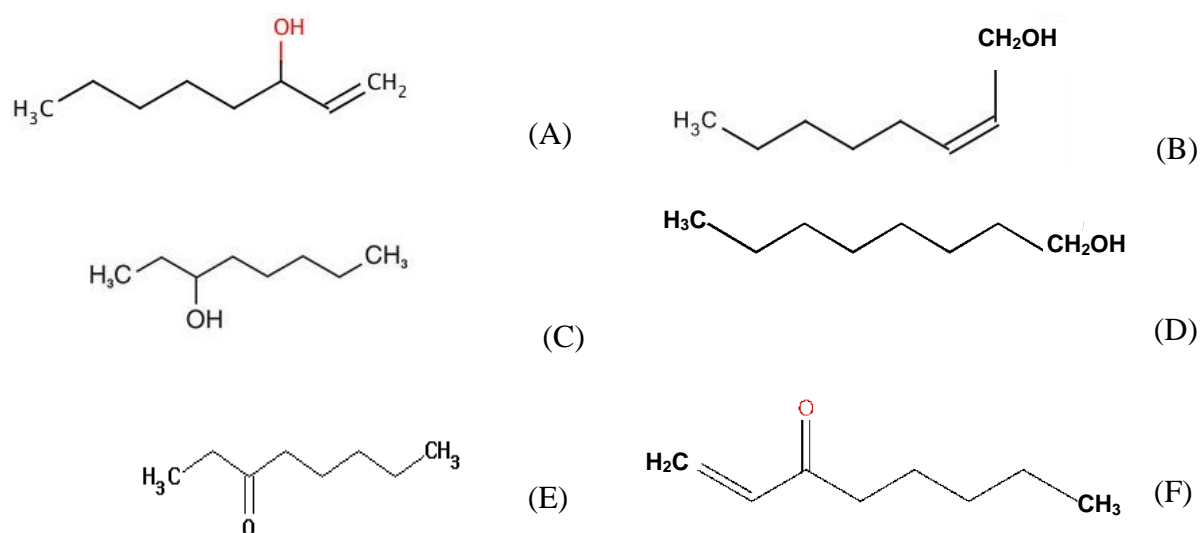


Fig. 4 - Compostos aromáticos. (A) 1-octen-3-ol; (B) 2-octen-1-ol; (C) 3-octanol; (D) 1-octanol; (E) 3-octanona; (F) 1-octen-3-ona.

O principal grupo de compostos voláteis existentes nos cogumelos são os álcoois, tendo já sido identificados mais de 40 compostos em diversas espécies (Jong & Birminghan, 1993). É neste grupo que se inclui o 1-octen-3-ol, o principal composto volátil das espécies macrofúngicas, muitas vezes designado por “álcool dos cogumelos” ou “álcool dos fungos” (Cho *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos aldeídos, o que normalmente se destaca é o benzaldeído que apresenta um odor característico a amêndoas, sendo encontrado na maioria das espécies. Este composto foi inclusivamente encontrado em várias espécies de cogumelos silvestres provenientes da região de Bragança (Nogueira *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo o

componente volátil maioritário encontrado foi o anisaldeído, aldeído com um cheiro característico a anis na espécie *Clitocybe odora* (Bull.).

As principais cetonas existentes nos cogumelos são também as derivadas do octano, sobretudo, a 3-octanona e a 1-octen-3-ona. Isto não significa que apenas estas cetonas estejam presentes, mas serão aquelas que estamos à espera que sejam identificadas em maior quantidade (Cho *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2008).

Os ésteres mais comuns nos cogumelos resultam da esterificação de ácidos gordos, como por exemplo os ésteres dos ácidos hexadecanóico, octadecanóico e octadecenóico (Çaglarirmak, 2007).

Finalmente, os compostos terpénicos e os seus derivados são, a par dos álcoois, uns dos principais componentes voláteis presentes nos cogumelos (Çaglarirmak, 2007; Pinho *et al.*, 2008). Até ao momento foram identificados quatro terpenos (*trans*-nerolidol, eucaliptol, mentol e 1,4-cineol) em cogumelos silvestres colhidos na zona de Trás-os-Montes, compostos até aí nunca identificados em cogumelos (Pinho *et al.*, 2008).

#### **1.4. Objetivos do trabalho**

Em termos gerais, no presente trabalho pretendeu-se estudar alguns aspetos do processo de secagem de diversas espécies de cogumelos comestíveis e avaliar o efeito deste método de conservação nas suas propriedades biológicas e fração volátil. No total foram estudadas quatro espécies de cogumelos, sendo três silvestres (*L. deliciosus*, *B. edulis* e *S. luteus*) e uma de cultura (*A. bisporus*).

Especificamente, pretendeu-se estudar nestas espécies de cogumelos:

- A atividade antioxidante e a fração volátil em exemplares frescos e secos, após terem sido submetidos a um processo de desidratação. A comparação dos resultados obtidos nas duas matrizes (fresco e seco) permitirá avaliar o efeito deste processo de conservação, quer nas propriedades biológicas como na fração volátil dos cogumelos estudados. Desse modo pretendeu-se verificar se ocorre formação de novos compostos, se alguns compostos desaparecem durante a secagem ou se aparecem em maior expressão, etc. A análise da fração volátil permitirá adicionalmente elucidar a natureza dos compostos responsáveis pelo aroma das espécies de cogumelos estudadas.

- A modelação do processo de secagem dos carpóforos com ar quente de forma a avaliar a existência de diferenças entre as espécies. Adicionalmente, pretendeu-se estudar o efeito da temperatura na secagem, seleccionar o melhor modelo matemático que se ajustasse de forma mais adequada às curvas de secagem e calcular as difusividades mássicas para as diferentes espécies de cogumelos e para as diferentes temperaturas estudadas.

## ***Capítulo II***

### ***Material e Métodos***

## **2.1. Amostras**

No presente trabalho estudaram-se três espécies de cogumelos silvestres (*L. deliciosus*, *B. edulis* e *S. luteus*) e uma espécie de cultura, *A. bisporus*. Os primeiros foram colhidos em pinhais e soutos entre Setembro de 2010 e Dezembro de 2011 na região de Bragança. A identificação foi feita de acordo com Courtecuisse (1999) e Courtecuisse & Duhem (2005). A espécie comercial *A. bisporus* foi, por sua vez, adquirida em supermercados da mesma região.

Foram processados cerca de 500 g de cada uma das amostras (pé e chapéu) que depois de lavadas foram divididas em porções para análise em fresco ou para serem sujeitas a desidratação por ar quente.

## **2.2. Tratamento das amostras e extrações realizadas**

Os cogumelos em fresco foram rapidamente processados, tendo-se realizado as extrações em soxhlet com metanol e acetona descritas na Seção 2.2.1.

Outra porção de cogumelo sofreu desidratação por convecção forçada em estufa (Memmert Schwabach 854) a 45 °C, tendo sido armazenada (cerca de 6 meses) no escuro na ausência de humidade. A estas amostras foram realizadas as extrações em soxhlet com metanol e acetona, tal como descrito na Seção 2.2.1.

### **2.2.1. Extrações realizadas**

Os cogumelos em fresco e secos foram extraídos com metanol e acetona, segundo o método descrito por Cheung & Ooi (2003). No caso dos cogumelos secos foram utilizadas cerca de 8 g de amostra, previamente triturada, enquanto no caso dos cogumelos frescos se utilizaram cerca de 17 g. As amostras foram submetidas a extrações metanólicas e com acetona (grau HPLC, Sigma- Aldrich) durante 3 horas usando um aparelho de soxhlet. De seguida, os extratos foram colocados no evaporador rotativo (Start Vacuum pump R-3022C) a 42 °C, até evaporação dos solventes respetivos. Após este período, os extratos foram redissolvidos no mesmo solvente utilizado na extração.

No caso dos cogumelos extraídos em fresco, devido ao seu elevado teor de humidade, não foi possível evaporar a água, e, portanto, não se calcularam os rendimentos de extração em mg de extrato/mL. Desse modo, optou-se por redissolver a solução até se obter uma concentração



de 50 mg de massa de cogumelo fresco/mL. De seguida, as soluções obtidas foram armazenadas no escuro a -18 °C.

No caso dos cogumelos extraídos em seco, foram calculados os rendimentos de extração e redissolveu-se a solução até se obter uma concentração de 50 mg de extrato/mL.

### 2.2.2. Determinação da Capacidade Redutora Total

A Capacidade Redutora Total ou o teor em fenóis totais foi determinada pelo ensaio colorimétrico descrito por Singleton & Rossi (1965) e utilizado em inúmeros trabalhos (Cheung *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2010). Resumidamente, 1 mL da solução de extrato foi misturada com 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, foi adicionado à mistura 1 mL de uma solução de carbonato de sódio saturada e ajustou-se o volume com água destilada para 10 mL. A reação foi mantida no escuro durante 90 minutos. O branco foi preparado da mesma forma, substituindo-se a amostra por metanol ou acetona. Após esse tempo, a mistura foi centrifugada (Labofuge 300) a 3500 rpm durante 3 minutos. Por fim, a absorvância foi lida a 725 nm num espectrofotómetro de ultravioleta-visível (Thermo, Genesys 10<sub>uv</sub>). Os conteúdos de fenóis totais de cada extrato foram determinados a partir de curvas de calibração preparadas com ácido gálico no caso do metanol (0,01 - 0,4 mM) e com  $\alpha$ -tocoferol no caso da acetona (0,12 - 2,3 mM). Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico ou de  $\alpha$ -tocoferol por gramas de matéria seca.

### 2.2.3. Atividade antioxidante

#### 2.2.3.1. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

O efeito bloqueador dos radicais livres DPPH foi avaliado pelo método descrito por Oliveira *et al.* (2008). Soluções de diferentes concentrações de extratos dos cogumelos (0,3 mL) foram misturadas com 2,7 mL de solução metanólica contendo os radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L). A mistura foi agitada vigorosamente e deixou-se repousar durante 60 min no escuro. A redução da absorvância do radical DPPH foi determinada através da medição a 517 nm ( $A_{\text{Amostra}}$ ). Em paralelo, preparou-se um controlo, no qual o extrato foi substituído por metanol ou acetona ( $A_{\text{DPPH}}$ ). A atividade bloqueadora aos radicais DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$(\%)Efeito\ bloqueador = \frac{A_{DPPH} - A_{Amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A partir das %s do efeito bloqueador em função das diferentes concentrações de extrato analisadas, calcularam-se os EC<sub>50</sub>, os quais correspondem à concentração de extrato que origina uma inibição de 50%.

#### 2.2.3.2. Poder Redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método descrito por Berker *et al.* (2007), com algumas modificações. Às soluções com diferentes concentrações de extrato dos cogumelos (1mL) foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% (m/v). Após agitação no vortex, a mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após este período, 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (m/v) foram adicionados. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante para outro tubo (2,5 mL), sendo adicionado 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto de ferro (III) a 0,1% (m/v) à mistura anterior. A absorvância da solução foi medida no espectrofotômetro de ultravioleta-visível (Thermo, Genesys 10<sub>uv</sub>) a 700 nm após 2 minutos da adição do último reagente. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão.

A concentração do extrato que originou uma absorvância igual a 0,5 foi calculada a partir do gráfico da absorvância a 700 nm em função da concentração de extrato, correspondendo ao valor do EC<sub>50</sub>.

#### 2.2.4. Determinação dos Compostos Voláteis

Os compostos voláteis presentes nos cogumelos frescos foram determinados nas primeiras 24 horas após colheita. Desse modo, os cogumelos foram envolvidos em folhas de alumínio logo após a sua colheita no campo e mantidos a 4 °C até determinação da fração volátil. Foram analisados três carpóforos diferentes de cada espécie. As espécies analisadas foram apenas as silvestres *L. deliciosus* e *B. edulis*.

#### 2.2.4.1. Padrões utilizados

Os compostos de referência utilizados no presente trabalho foram adquiridos a vários fornecedores, designadamente, o 3-Metil-1-butanol, (*E*)-2-Octen-1-ol, (*E*)-2-Nonen-1-ol, (*E*)-2-Decen-1-ol, 3-Metilbutanal, 2-Metilbutanal, Octanal, (*E*)-2-Octenal, Limoneno e Linalol foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); 1-Octen-3-ol, Hexanal, Benzaldeído e Fenilacetaldeído foram obtidos à SAFC (Steinheim, Alemanha); *o*-Cimeno foi obtido à Fluka (Buchs, Suíça).

#### 2.2.4.2. Extração dos compostos voláteis por Micro Extração em Fase Sólida (HS-SPME)

Várias fibras comerciais podem ser usadas para extrair compostos voláteis. Contudo, a fibra utilizada no presente trabalho foi a revestida com divinilbenzeno/polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) de 65 µm de espessura. Esta fibra foi a escolhida tendo em conta a bibliografia consultada, as recomendações da Supelco (Bellefonte, PA) (fornecedor), e a experiência do grupo de investigação onde a tese foi realizada, o qual tem efetuado alguns trabalhos na extração e análise de compostos voláteis em diferentes matrizes (Malheiro *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011), inclusive cogumelos (Pinho *et al.*, 2008).

Em mais pormenor, os cogumelos foram previamente cortados em pedaços de pequenas dimensões. Cerca de 5 g de amostra foram colocados num vial de 50 mL com 5 mL de água desionizada e um agitador de forma a obter-se uma adequada homogeneização. O frasco foi então selado com uma tampa de polipropileno com septo em PTFE (Supelco). Esta mistura foi agitada (300 rpm) a 40 °C durante 5 minutos. Em seguida, a fibra DVB/PDMS foi inserida e exposta no espaço superior do vial, durante 30 minutos (300 rpm a 40 °C). Depois desse período, a fibra foi puxado para dentro da agulha, tendo o dispositivo de SPME sido removido do frasco e inserido na porta de injeção do sistema de GC. A análise HS-SPME foi realizada em triplicado. O mesmo procedimento foi realizado com uma amostra de controlo contendo apenas água.

#### 2.2.4.3. Análise dos compostos voláteis por Cromatografia Gasosa (GC) - Espectrometria de Massa (MS)

Os compostos retidos na fibra foram eluídos por dessorção térmica. Após 1 minuto no injetor do GC, a fibra foi removida e colocada durante 10 minutos, a 250 °C no injetor de outro GC, de forma a garantir a remoção de todos os compostos voláteis.

A detecção e quantificação dos compostos foram realizadas num cromatógrafo gasoso Varian CP-3800, acoplado a um Espectrómetro de Massa (Varian Saturno 4000 e software versão 6.8). O cromatógrafo gasoso era constituído por duas colunas: uma VF-5 ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) da Varian e uma segunda da Stabilwax-DA de sílica fundida (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Restek, EUA) para verificar a identidade de alguns compostos encontrados na primeira. O injetor encontrava-se a 220 °C. As injeções foram realizadas no modo de split/splitless. A fase móvel foi constituída por hélio C-60 (Gasin, Portugal), a um caudal de 1 mL/min. A temperatura do forno foi fixada em 40 °C durante 1 min, sendo depois aumentada em 2 °C/min até atingir os 220 °C, e mantida a esta temperatura durante 30 min. Todos os espectros de massa foram adquiridos através do impacto de electrões (EI). A ionização foi mantida desligada durante o primeiro minuto. As temperaturas da linha de transferência, *manifold* e armadilha do detetor foram de 280, 50 e 180 °C, respetivamente. A massa variou de m/z 40 a 350, com uma velocidade de varrimento de 6 scan/s. A emissão atual foi de 50 µA, o procedimento de multiplicação de eletrões foi definido no modo *Autotune*, com um tempo de ionização máximo de 25000 µs e com um nível de armazenamento de ionização de m/z 35. As análises foram realizadas em modo *full-scan*.

Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos cromatográficos com os de padrões analisados sob as mesmas condições e por comparação dos índices de retenção (exemplo, índice de Kovats) fornecidos pela literatura. Os espectros dos fragmentos MS foram comparados com os obtidos através de uma base de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) MS 05, e com os espectros dos compostos puros. A confirmação foi também realizada utilizando uma base de dados do laboratório, construída pelos espectros MS, recolhidos a partir de corridas cromatográficas de compostos puros realizados no mesmo equipamento e sob as mesmas condições. Para fins de quantificação, cada amostra foi injetada em triplicado, e as áreas dos picos cromatográficos (expressas em kcounts) foram determinadas através de um cromatograma de varredura completa, usando para cada composto alguns iões de quantificação específicos. Estes correspondiam à base de iões (m/z 100% intensidade), ião molecular (M<sup>+</sup>), e um outro ião

característico de cada molécula. Alguns picos que foram co-eluídos foram analisados em *full-scan* (resolução valor < 1) e integrados com um valor de resolução > 1.

### **2.3. Modelação do processo de secagem**

Depois de terem sido previamente limpos, os cogumelos foram laminados com uma espessura média de 0,2 cm. De seguida foram cortados em retângulos de dimensões semelhantes e colocados em placas de Petri, tal como mostrado na Figura 5.



Fig. 5 - Preparação das amostras de cogumelos a utilizar nos ensaios de secagem

Os ensaios de secagem foram realizados às temperaturas de 35, 45 e 55 °C. A cada temperatura, as caixas de Petri com as amostras foram sendo retiradas a intervalos de tempo regulares e colocadas num exsiccador. Após arrefecimento, as amostras foram pesadas. Os testes de secagem foram repetidos quatro vezes para cada condição experimental.

Paralelamente aos ensaios de secagem, a matéria seca dos cogumelos foi avaliada através da determinação do teor de humidade, através da Equação 4:

$$\text{Matéria seca (\%)} = 100 - \text{Teor de Humidade (\%)} \quad \text{Equação 4}$$

Para determinar o teor de humidade, uma porção de cogumelos (aproximadamente 2 g, rigorosamente pesada) foi colocada em cadinhos na estufa a 105 °C durante 24 horas. Após este período, os cadinhos foram colocados num exsiccador até arrefecerem, tendo sido posteriormente pesados. Repetiu-se o processo até se atingir peso constante.

### 2.3.1. Análise e modelação do processo de secagem

Para analisar e modelar o processo de secagem, começou-se por calcular os rácios de humidade ( $mr$ ), grandeza adimensional, calculados através Equação 1. De seguida, traçaram-se os gráficos do  $mr$  versus tempo e a fim de modelar o comportamento de secagem das espécies de cogumelos estudadas foram testados vários modelos matemáticos, designadamente os descritos na Tabela 1.

Os parâmetros destes modelos foram determinados por análise estatística através do software MATLAB®, usando a opção “Curve Fitting”. A qualidade dos ajustes foi avaliada através dos parâmetros *Sum Squared Error (SSE)*, *Root Mean Squared Error (RMSE)*, *Mean Square Error (MSE)*,  $R^2$  e  $R^2$  ajustado, calculados através das seguintes fórmulas:

$$SSE = \sum_{i=1}^n (y_{experimental} - y_{modelo})^2 \quad \text{Equação 5}$$

$$RMSE = \sqrt{MSE} = \sqrt{\frac{SSE}{\vartheta}} \quad \text{Equação 6}$$

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad \text{em que} \quad SST = \sum_{i=1}^n (y_{experimental} - y_{médio})^2 \quad \text{Equação 7}$$

$$Adjusted R - square = 1 - \frac{SSE \times (n-1)}{SST \times \vartheta} \quad \text{com } \vartheta = n - m \quad \text{Equação 8}$$

, onde  $m$  é o número de parâmetros dos modelos e  $n$  o número de observações.

As velocidades de secagem ( $-\frac{\partial W}{\partial t}$ ), expressas em [g de água/(g de matéria seca  $\times$  min)], foram determinadas através do método de aproximação das diferenças finitas e descrito por Guiné *et al.* (2005). Desse modo, utilizaram-se as seguintes expressões:

Para  $t = t_0$

$$\frac{dw}{dt} = \frac{w_1 - w_0}{t_1 - t_0} \quad \text{Equação 9}$$

Para  $t = t_i$  ( $i = 1, \dots, N-1$ )

$$\frac{dw}{dt} = \frac{w_{i+1} - w_{i-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \quad \text{Equação 10}$$

Para  $t = t_N$

$$\frac{dw}{dt} = \frac{w_N - w_{N-1}}{t_N - t_{N-1}} \quad \text{Equação 11}$$

Também se determinaram as difusividades mássicas para os cogumelos em estudo. Para o efeito utilizou-se a 2ª Lei de Fick, aplicada a sólidos de forma aplainada e considerando que a resistência externa era desprezável, tal como descrita na Equação 2, apresentada na Seção 1.2.1.

Considerando só o 1º termo e aplicando logaritmos:

$$\underbrace{\frac{w-w_e}{w-w_e}}_{mr} = \frac{8}{\pi^2} \left[ e^{-\frac{\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} \right] \quad \text{Equação 12}$$

$$\ln \frac{w-w_e}{w-w_e} = \ln \left[ \frac{8}{\pi^2} \left[ e^{-\frac{\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} \right] \right] \quad \text{Equação 13}$$

$$\ln \frac{w-w_e}{w-w_e} = \ln \frac{8}{\pi^2} + \ln \left[ e^{-\frac{\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}} \right] \quad \text{Equação 14}$$

$$\underbrace{\ln \frac{w-w_e}{w-w_e}}_y = \underbrace{\ln \frac{8}{\pi^2}}_a - \underbrace{\frac{\pi^2}{4} \times \frac{Dt}{L^2}}_{-bx} \quad \text{Equação 15}$$

, onde D = Difusividade mássica e L = espessura.

Ao representar graficamente o  $\ln \frac{w-w_e}{w-w_e}$  versus tempo, obter-se-á uma reta com declive igual a  $-\frac{\pi^2}{4} \times \frac{D}{L^2}$  e ordenada na origem de  $\ln \frac{8}{\pi^2}$ . Desse modo, a difusividade pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$D = \textit{declive} \times \frac{-4L^2}{\pi^2} \quad \text{Equação 16}$$

#### **2.4. Tratamento estatístico**

Os resultados relativos às propriedades antioxidantes e fração volátil dos cogumelos são apresentados na forma de valores médios  $\pm$  desvio padrão (n=3) e foram submetidos a análise de variância convencional, pelo teste ANOVA, usando o programa SPSS v.17. Nos casos em que se verificou diferenças estatísticas utilizou-se o teste de Tukey para comparar as médias. Adicionalmente foi aplicada uma Análise de Componentes Principais (PCA) aos compostos voláteis identificados nas espécies de cogumelos analisadas.



## *Capítulo III*

### *Resultados e Discussão*

### 3.1. Rendimentos de extração

Devido ao elevado teor em água dos cogumelos frescos, as soluções de extratos metanólicos e de acetona obtidos para estes cogumelos apresentaram um teor considerável de água, mesmo após a sua permanência no evaporador rotativo de forma a evaporar os solventes. Além disso, uma vez que não foi possível liofilizar os extratos obtidos de modo a retirar a água presente, apenas se calcularam os rendimentos de extração para o caso dos cogumelos secos, onde a presença da água não foi visível nas soluções de extratos. Os rendimentos de extração obtidos para os cogumelos secos estudados encontram-se representados na Figura 6.

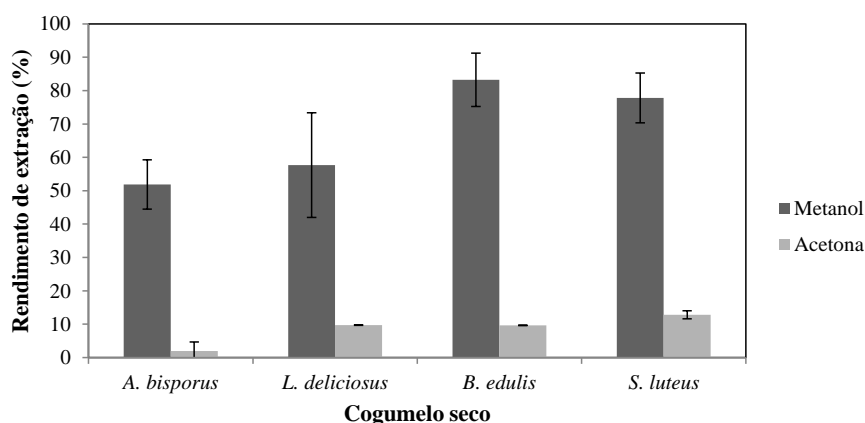


Fig. 6 - Rendimentos de extração obtidos para os cogumelos secos sujeitos a extrações com metanol e acetona.

Constatou-se que os maiores rendimentos de extração foram obtidos com o metanol para os quatro cogumelos analisados, variando entre 52 e 83%. Pelo contrário, menores valores de rendimento de extração foram obtidos com acetona. Isto deve-se ao facto da maior parte dos componentes solúveis presentes nos cogumelos serem polares e dessa forma terem uma maior afinidade pelo metanol (maior polaridade) do que pela acetona (menor polaridade).

Em relação à espécie de cogumelo, verificou-se que para o caso do metanol o *B. edulis* apresentou o maior rendimento de extração (83,2%), seguido pelo *S. luteus* (77,8%). Pelo contrário, o cogumelo comercial *A. bisporus* foi aquele que apresentou o menor rendimento de extração (51,9%). Contudo, este valor foi semelhante ao determinado para o *L. deliciosus* (57,7%).

Já em relação à acetona, os rendimentos de extração determinados para o *S. luteus*, *B. edulis* e *L. deliciosus* foram semelhantes entre si (12,8; 9,66 e 9,72%, respetivamente). Novamente, o *A. bisporus* foi aquele que apresentou o menor rendimento de extração (1,90%).

Os resultados do presente trabalho vão de encontro aos descritos por Moure *et al.* (2000), os quais referem que os maiores rendimentos de extração de compostos fenólicos foram obtidos quando se utilizaram solventes de maior polaridade, tendo sido determinados rendimentos de extração superiores com metanol do que com acetona.

### **3.2. Capacidade Redutora Total**

Na avaliação da capacidade redutora total e, uma vez que o metanol e a acetona (solventes usados nas extrações) apresentam polaridades diferentes, optou-se por construir retas de calibração distintas, preparadas com compostos de diferente polaridade. No caso do metanol utilizou-se o ácido gálico, enquanto na acetona se usou o  $\alpha$ -tocoferol. Os resultados obtidos para os dois solventes aplicados às quatro espécies de cogumelos analisados em fresco e secos, estão representados na Figura 7.

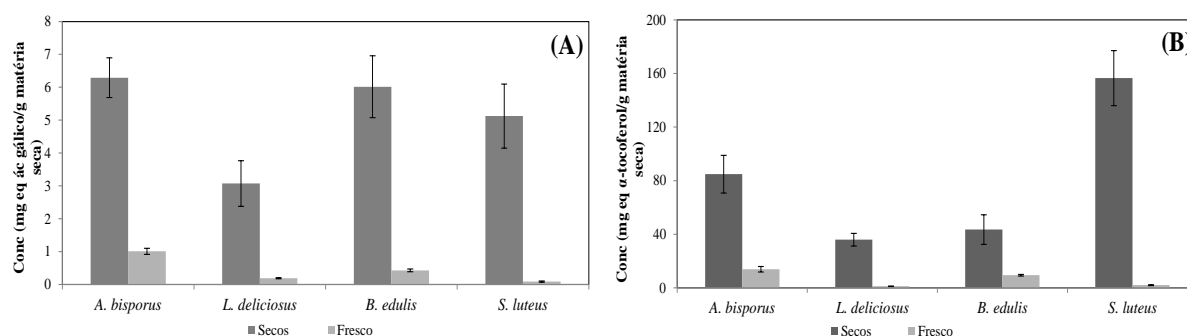


Fig. 7 - Capacidade redutora total obtida para os extratos preparados em metanol (A) e acetona (B).

Para ambos os solventes, observou-se que os cogumelos secos apresentaram sempre uma maior quantidade de compostos fenólicos, traduzida numa maior capacidade redutora total, face aos frescos, demonstrando que a secagem é um processo que favorece a produção de compostos com atividade antioxidante, aumentando o potencial biológico dos produtos. Ao avaliar o nível de significância da interação cogumelo $\times$ estado, verificou-se que esta foi bastante significativa ( $p < 0,001$ ). Em relação ao metanol (Figura 7A e Tabela 3), e ao comparar as diferentes espécies de cogumelos entre si, verificou-se que tanto nos exemplares secos como nos frescos, a maior capacidade redutora total foi obtida para o *A. bisporus*, seguida do *B. edulis*. No caso da acetona, mais uma vez o *A. bisporus* se destacou. Contudo, nos cogumelos secos o *S. luteus* foi aquele que apresentou a maior capacidade redutora total (156 mg equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol/g matéria seca), evidenciando-se em relação às restantes espécies.

Tabela 3 - Capacidade redutora total (mg eq ácido gálico/g de matéria seca ou mg eq  $\alpha$ -tocoferol/g de matéria seca) dos diferentes extratos de cogumelos preparados com metanol e acetona.<sup>a</sup>

		<i>A. bisporus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>S. luteus</i>
Metanol	Seco	6,29±0,60a	3,07±0,70b	6,02±0,94a	5,12±0,97a
	Fresco	1,01±0,09a	0,19±0,02b	0,43±0,04c	0,09±0,02d
Acetona	Seco	84,8±14,1a	36,0±4,76b	43,5±11,0b	156±20,5c
	Fresco	13,9±2,04a	1,19±0,19b	9,45±0,63c	2,01±0,38d

<sup>a</sup>Valores expressos em médias  $\pm$  Desvio padrão de medições realizadas em triplicado. As médias representadas na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

O conteúdo total em compostos fenólicos determinado para o *A. bisporus* seco em metanol, determinado no presente trabalho ( $6,29 \pm 0,60$  mg de GAE/ g de matéria seca), foi idêntico ao obtido por Choi & Sapers (1994), os quais referem uma concentração de  $5,4 \pm 0,85$  mg de GAE/g de matéria seca para extratos preparados a partir de cogumelos desta espécie.

Em relação aos cogumelos secos e extraídos em metanol pudemos ainda verificar que os nossos resultados estão de acordo com os mencionados por Keles *et al.* (2011), os quais determinaram para *A. bisporus*, *L. deliciosus* e *S. luteus* colhidos na Turquia as concentrações de 4,02; 2,71 e 5,06 mg de GAE/g de matéria seca de cogumelo, respetivamente. Em relação ao *B. edulis*, uma concentração mais elevada foi determinada por esses autores (12,8 mg de GAE/g de matéria seca), sendo praticamente o dobro do encontrado no presente trabalho.

Ao analisar os resultados obtidos verificou-se que os extratos preparados a partir de alguns tipos de cogumelos secos, nomeadamente *A. bisporus* e *B. edulis*, em metanol e *S. luteus* em acetona, demonstraram ter uma capacidade redutora total interessante. Também se verificou que os cogumelos de cultura (*A. bisporus*) não apresentaram necessariamente uma capacidade redutora total inferior à dos silvestres.

Numerosos estudos mostram de forma conclusiva que o consumo de alimentos com alto teor em compostos fenólicos pode reduzir o risco de várias doenças. Desse modo, uma vez que os cogumelos analisados no presente trabalho sugerem conter este tipo de compostos e demonstram ter potencial para atuarem como antioxidantes naturais, o seu consumo deve ser incentivado.

### **3.3. Atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante dos extratos varia com as condições aplicadas nos ensaios, podendo ser influenciada por diversos fatores. Deste modo, de forma a fazer uma descrição mais precisa e quantitativa não deve ser utilizado apenas um método. No presente trabalho as propriedades antioxidantes dos cogumelos foram avaliadas através de dois métodos diferentes, o do efeito bloqueador dos radicais livres DPPH e o poder redutor.

#### **3.3.1. Efeito bloqueador dos radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)**

O efeito bloqueador dos radicais livres é um mecanismo há muito conhecido. O DPPH é um radical livre estável que possui um máximo de absorção característico entre os 515 e 517 nm, o qual diminui na presença de compostos antioxidantes após aceitação de um eletrão ou de um átomo de hidrogénio.

Uma solução preparada de fresco de DPPH apresenta uma cor púrpura intensa. Contudo, na presença de antioxidantes a cor vai diminuindo e por consequência observa-se uma diminuição da absorvância.

No presente trabalho foram então estudados e comparados o potencial de captura dos radicais livres de DPPH de extratos de metanol e acetona das quatro espécies de cogumelos, tanto frescos como secos (Figura 8). Através da análise dessa mesma figura, observou-se que quanto maior a concentração de extrato utilizada, maior a atividade bloqueadora determinada.

Tendo em conta o estado do cogumelo, verificou-se que para se obter efeitos bloqueadores idênticos, tiveram-se que usar soluções de extrato mais concentradas para os cogumelos frescos do que para os secos, demonstrando novamente o maior potencial bioativo destes últimos.

Em relação aos cogumelos frescos extraídos em metanol, verificou-se que o *S. luteus* e o *B. edulis* apresentaram os valores mais elevados (82,3 e 79,5% para uma concentração próxima de 10 mg amostra seca/mL), respetivamente. Comportamento idêntico foi observado para os extratos em acetona.

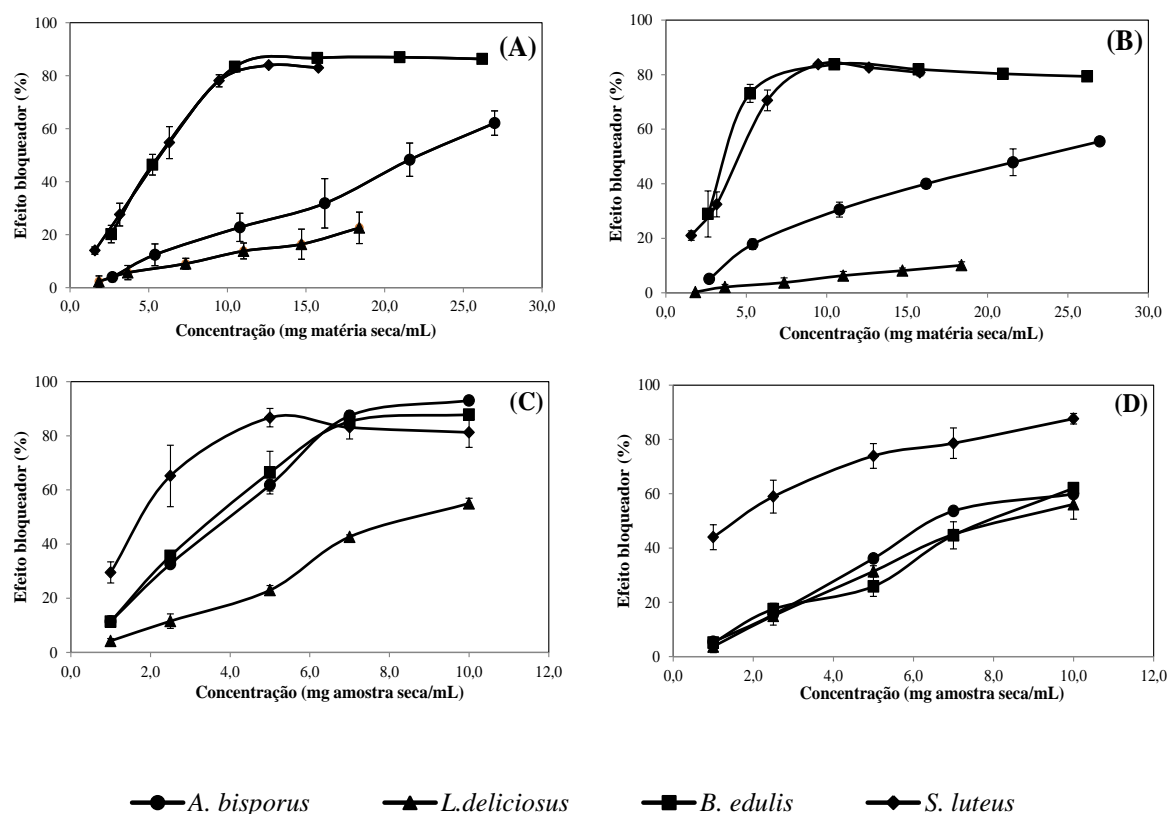


Fig. 8 - Efeito bloqueador dos radicais livres DPPH (%) para extratos preparados com: (A) Cogumelos frescos em metanol; (B) Cogumelos frescos em acetona; (C) Cogumelos secos em metanol; e (D) Cogumelos secos em acetona.

No que diz respeito aos cogumelos secos, verificou-se que nas extrações com metanol foram geralmente obtidos valores mais elevados de efeito bloqueador quando comparados com os de acetona, com a exceção do *L. deliciosus*. Para esta espécie observaram-se resultados idênticos para os extratos preparados a partir dos dois solventes estudados. O *S. luteus* foi aquele que apresentou os valores mais elevados no caso da acetona e do metanol. Contudo, no caso deste solvente, o *A. bisporus* e o *B. edulis* forneceram resultados idênticos aos observados para o *S. luteus*, apresentando estas três espécies de cogumelos um potencial antioxidante interessante.

Tendo em conta todos os resultados, a maior percentagem de efeito bloqueador dos radicais livres DPPH foi obtida para o *A. bisporus* seco (93,0% a 10 mg de amostra seca/mL) na extração com metanol, que foi aquela que também originou extratos com uma maior quantidade de compostos fenólicos (Tabela 3).

Relativamente aos valores de  $EC_{50}$  (Figura 9), verificou-se que os cogumelos frescos apresentaram valores de  $EC_{50}$  mais elevados comparativamente aos secos, com a exceção do *B. edulis* extraído em acetona. Em termos gerais, voltou-se a verificar uma menor atividade antioxidante para os cogumelos frescos face aos secos.

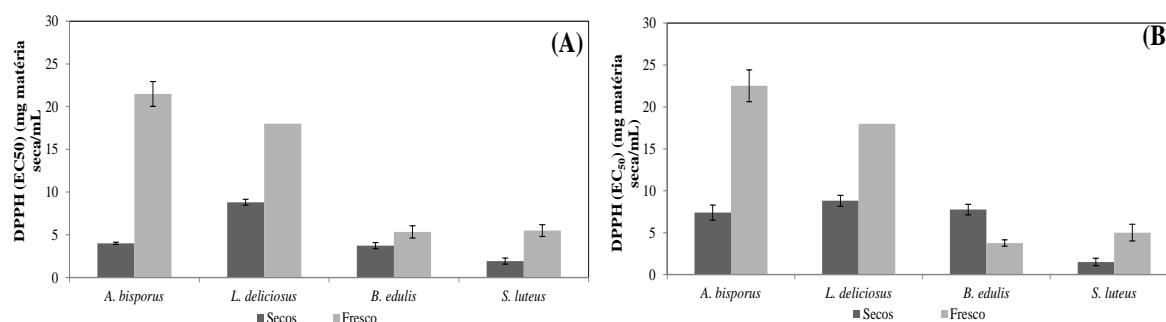


Fig. 9 -  $EC_{50}$ , expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do efeito bloqueador do DPPH para as extrações realizadas em metanol (A) e acetona (B).

Na Tabela 4 são apresentados os valores de  $EC_{50}$  obtidos para os diferentes cogumelos, em cada uma das extrações. No caso dos cogumelos secos, os extratos de metanol e acetona do *S. luteus* revelaram melhores propriedades antioxidantes do que os restantes (menores valores de  $EC_{50}$ ). Já no caso dos cogumelos frescos, o *B. edulis* foi aquele que apresentou os menores valores de  $EC_{50}$ . Contudo, no caso do metanol, este valor não foi significativamente diferente ao determinado para o *S. luteus*. Como para esta espécie de cogumelo se determinaram os menores valores de  $EC_{50}$  após secagem, os resultados indicam que durante a desidratação deste cogumelo se produzem compostos bioativos com propriedades antioxidantes.

Tabela 4 – Valores de  $EC_{50}$  (mg matéria seca/mL) determinados no ensaio do efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH dos diferentes extratos de cogumelos obtidos por diferentes solventes<sup>a</sup>.

		<i>A. bisporus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>S. luteus</i>
<b>Metanol</b>	Seco	3,99±0,14a	8,81±0,34b	3,73±0,36a	1,92±0,35c
	Fresco	21,5±1,45 <sup>a</sup>	>18,0 b	5,34±0,72c	5,50±0,69c
<b>Acetona</b>	Seco	7,39±0,90a	8,80±0,66b	7,75±0,63a	1,50±0,45c
	Fresco	22,5±1,90a	>18,0 b	3,77±0,38c	5,00±1,00d

<sup>a</sup>Valores expressos em médias ± S.D. de medições em triplicado. As médias representadas na mesma linha com letras diferentes (a-d), foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.2. Poder Redutor

Neste ensaio, a presença de redutores (antioxidantes) nos extratos provoca a redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricianeto à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), provocando uma mudança de cor da solução de amarelo para tons de verde e azul. Assim através da medição da absorvância a 700 nm pode-se calcular a concentração do  $\text{Fe}^{2+}$ . Uma maior absorvância a 700 nm indica um maior poder de redução.

A Figura 10 mostra o poder redutor dos extratos metanólicos e em acetona das quatro espécies de cogumelos estudadas em função da sua concentração. Verificou-se que o poder redutor dos cogumelos aumentou com o aumento da concentração, tanto nas soluções metanólicas como em acetona.

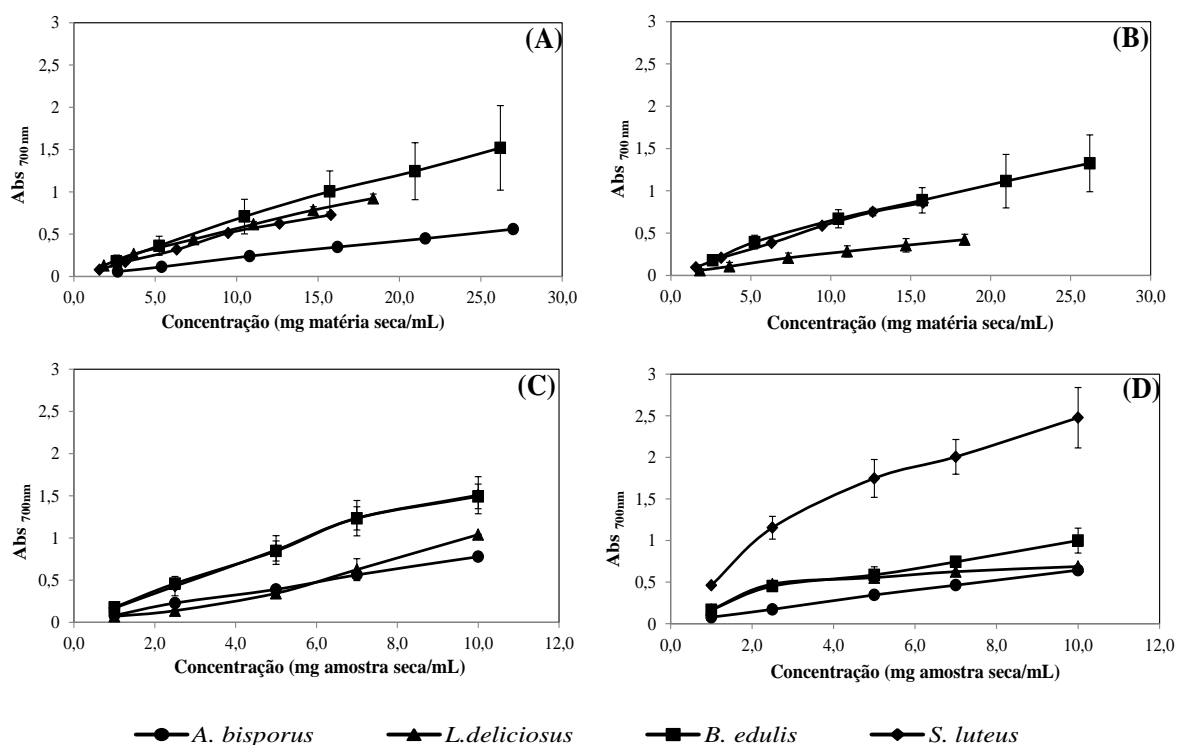


Fig. 10 - Poder redutor de extratos preparados com: (A) Cogumelos frescos em metanol; (B) Cogumelos frescos em acetona; (C) Cogumelos secos em metanol; (D) Cogumelos secos em acetona.

O poder redutor dos cogumelos secos foi superior em todas as espécies face ao obtido para os cogumelos frescos, atingindo-se valores mais elevados de absorvância com menores concentrações de extrato. O *S. luteus* seco e extraído com acetona destacou-se em relação aos restantes, apresentando um excelente poder redutor. Este resultado foi semelhante ao obtido anteriormente no ensaio do efeito bloqueador dos radicais livres do DPPH e pode ser explicado pela presença de uma maior quantidade de compostos antioxidantes, uma vez que



os extratos de acetona desta espécie foram aqueles que apresentaram a maior capacidade redutora total, igual a  $156 \pm 20,5$  mg equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol/g matéria seca (Tabela 3).

Na Figura 11 e Tabela 5 encontram-se representados e indicados os valores de  $EC_{50}$  determinados para o poder redutor dos diferentes extratos preparados a partir das quatro espécies de cogumelos analisadas.

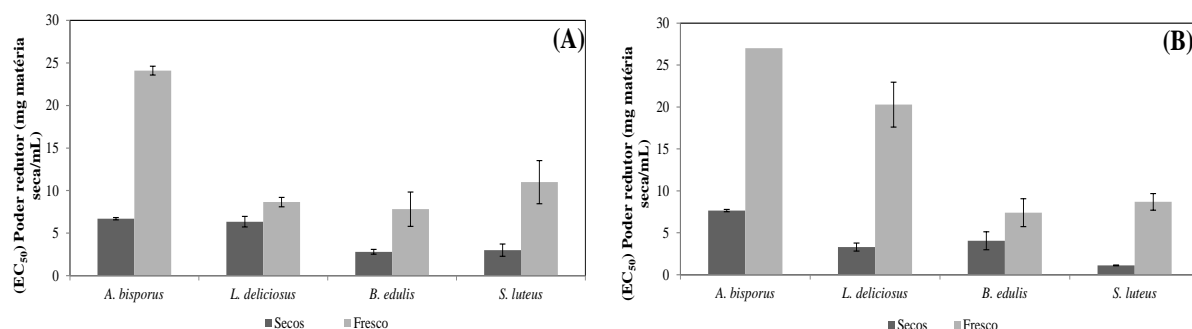


Fig. 11 - Valores de  $EC_{50}$ , expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do Poder Redutor para os extratos preparados a partir de metanol (A) e acetona (B).

Para o poder redutor, os cogumelos frescos apresentaram sempre maiores valores de  $EC_{50}$  face aos secos, observando-se diferenças significativas entre as espécies. Em relação aos cogumelos secos e nas extrações metanólicas, o *B. edulis* e o *S. luteus* revelaram melhores propriedades antioxidantes do que as restantes espécies, apresentando os menores valores de  $EC_{50}$ . Em relação às extrações com acetona, o *S. luteus* e o *L. deliciosus* foram os que apresentaram um poder redutor superior. Desse modo, verificou-se que os cogumelos silvestres apresentaram uma atividade antioxidante superior, avaliada pelo poder redutor, face ao cogumelo de cultura, *A. bisporus*.

Tabela 5 - Valores de  $EC_{50}$ , expressos em mg de matéria seca/mL, determinados no ensaio do Poder Redutor para os extratos preparados a partir de metanol e acetona, envolvendo cogumelos secos e frescos<sup>a</sup>.

		<i>A. bisporus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>B. edulis</i>	<i>S. luteus</i>
<b>Metanol</b>	Seco	6,69±0,13a	6,34±0,62a	2,80±0,28b	3,00±0,72b
	Fresco	24,1±0,52a	8,64±0,55b	7,81±2,02b	11,0±2,53c
<b>Acetona</b>	Seco	7,65±0,13a	3,29±0,48b	4,06±1,07b	1,11±0,04c
	Fresco	>27,0 b	20,3±2,67b	7,41±1,66c	8,69±0,99d

<sup>a</sup>Valores expressos em médias  $\pm$  desvio padrão de medições realizadas em triplicado. As médias representadas na mesma linha com letras diferentes (a-d), foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Modelação do processo de secagem

A maior parte dos cogumelos comestíveis silvestres e de cultura são comercializados em fresco. Contudo, devido à sua elevada perecibilidade, em algumas situações recorre-se à secagem. No presente trabalho pretendeu-se estudar a desidratação por convecção em ar quente de duas espécies silvestres - *S. luteus* e *L. deliciosus*, muito apreciadas na zona de Trás-os-Montes, e uma de cultura - *A. bisporus*. Nesse sentido, aos dados obtidos durante a secagem, aplicaram-se modelos teóricos e empíricos encontrados na literatura. A utilização destes modelos na indústria é de extrema utilidade, pois permite compreender e controlar de forma mais rigorosa os processos de secagem, minimizando custos e otimizando as características do produto.

Os dados experimentais obtidos para as três espécies estudadas no presente trabalho, sujeitas à secagem a três temperaturas distintas (35, 45 e 55 °C), encontram-se indicados na Figura 12.

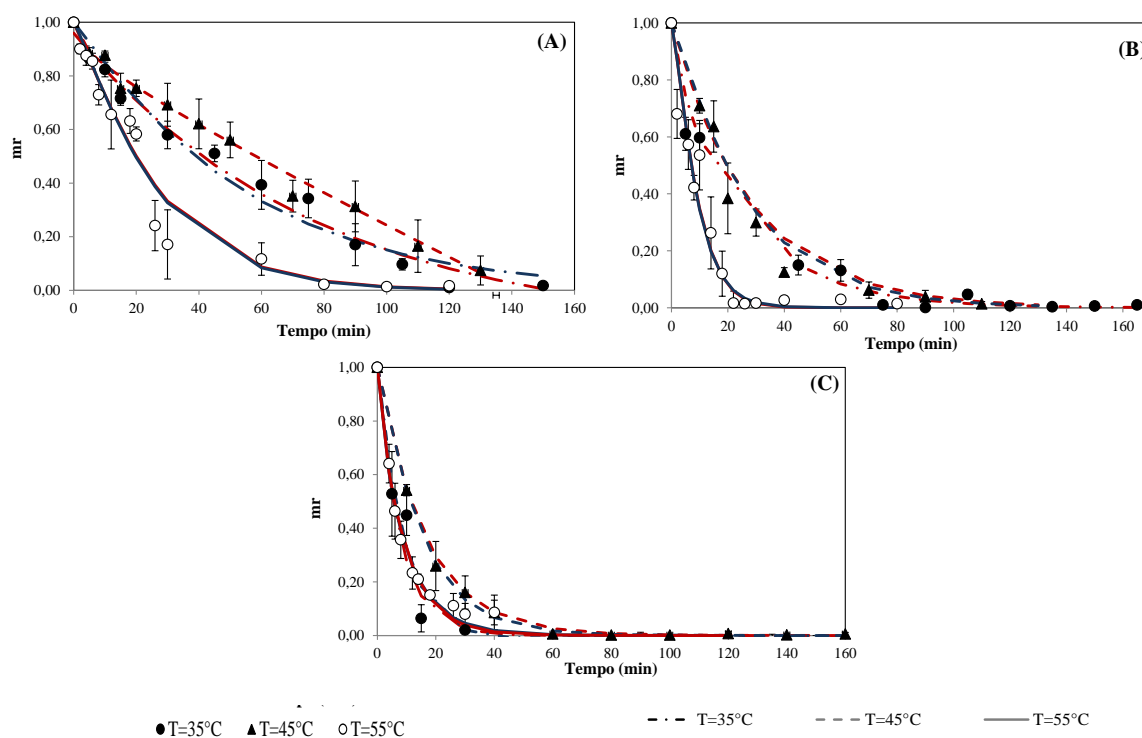


Fig. 12 - Curvas de secagem do (A) *S. luteus*, (B) *L. deliciosus*, e (C) *A. bisporus* (As curvas a vermelho representam o melhor modelo e as curvas a azul o modelo que a cada uma das temperaturas apresentou o segundo melhor ajuste).

Ao observar a figura verificaram-se diferenças entre as espécies. Contudo, o *L. deliciosus* e o *A. bisporus* foram aquelas que apresentaram curvas de secagem mais semelhantes. Pelo

contrário, o *S. luteus* foi a espécie que apresentou um comportamento na secagem mais distinto de entre as três estudadas, demorando mais tempo para que se atingisse um dado *mr*. Este resultado pode dever-se à presença nesta espécie de cogumelo de uma “película” que funciona como uma barreira (resistência adicional) à transferência de água do interior para o exterior.

Foi também visível que para se atingir um dado *mr* foi necessário menos tempo quando se utilizaram temperaturas mais elevadas. Desse modo, os valores de *mr* decresceram mais rapidamente à temperatura de 55 °C do que a 35 ou a 45 °C. Observou-se, contudo, uma exceção no *A. bisporus*. Nesta espécie de cogumelo, a curva dos 35 °C foi semelhante à obtida para os 55 °C, sobrepondo-se ambas. No entanto, o *A. bisporus* foi a espécie que às três temperaturas estudadas apresentou as curvas de secagem mais próximas.

De forma a realizar a modelação do processo de secagem, aplicaram-se aos dados experimentais diversos modelos, designadamente os modelos *Diffusion Approach*, Newton, Page, Henderson e Pabis, *Two-term exponential*, Logarítmico, Midilli e *Two-term*, estando as equações obtidas para cada um deles indicadas na Tabela 6. A partir dos valores dos parâmetros estatísticos determinados foi possível concluir que a qualidade do ajuste das curvas de secagem é na sua maioria boa, com exceção de alguns modelos a algumas temperaturas estudadas. A aceitação do modelo de secagem baseou-se no valor do coeficiente  $R^2$  o qual ao apresentar valores próximos de 1 indicará a existência de um melhor ajuste e do SSE e RMSE, para os quais é desejável obter valores próximos de zero. Os resultados mostraram que os modelos que descreveram melhor a secagem do *S. luteus* a 35, 45 e 55 °C foram o Logarítmico, Midilli e o *Two term exponential*, respetivamente. Em relação ao *L. deliciosus* o modelo *Two term exponential* mostrou ser o melhor a 35 e 55 °C, enquanto o de Newton se evidenciou dos restantes a 45 °C. No que diz respeito ao cogumelo de cultura *A. bisporus*, o modelo que melhor descreveu a secagem foi novamente o de Newton a 35 e 45 °C, enquanto a 55 °C foi o *Diffusion Approach* que se destacou.

Tabela 6 - Análise estatística aos modelos aplicados aos dados experimentais obtidos durante a secagem das três espécies de cogumelos às temperaturas de 35, 45 e 55 °C.

Espécie	Temperaturas (°C)	Modelos	Parâmetros	SSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	RMSE
<i>Suillus luteus</i>	35	<i>Diffusion Approach</i>	a = -11,07; b = 0,9656; k = 0,02695	0,04972	0,9695	0,9640	0,06723
		<i>Newton</i>	k = 0,01846	0,05648	0,9654	0,9654	0,01396
		<i>Page</i>	k = 0,01415; n = 1,064	0,05214	0,9680	0,9653	0,06592
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 0,9858; k = 0,01814	0,05657	0,9653	0,9624	0,06866
		<i>Two-term exponential</i>	a = 0,02166; k = 0,8297	0,05520	0,9661	0,9633	0,06782
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,114; b = -0,1545; k = 0,01294	0,03880	<b>0,9762</b>	0,9719	0,05939
		<i>Midilli</i>	a = 1; b = 0,001119; k = 55,25; n = 84,89	2,505	-0,5369	-0,9980	0,5005
		<i>Two-term</i>	a = 0,9858; b = 0,01813; c = 2,221e-14; d = 2,3e-14	0,05763	0,9646	0,9582	0,07238
	45	<i>Diffusion Approach</i>	a = -10,04; b = 0,9587; k = 0,02194	0,02583	0,9737	0,9679	0,05358
		<i>Newton</i>	k = 0,01404	0,02894	0,9706	0,9706	0,05129
		<i>Page</i>	k = 0,01024; n = 1,077	0,02749	0,9720	0,9692	0,05243
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 0,9926; k = 0,01388	0,02870	0,9708	0,9679	0,05357
		<i>Two-term exponential</i>	a = 1,578; k = 0,01793	0,02586	0,9737	0,9711	0,05085
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,553; b = -0,5971; k = 0,006387	0,01356	0,9862	0,9831	0,03882
		<i>Midilli</i>	a = 1; b = -0,005254; k = 0,04929; n = 0,3641	0,007858	<b>0,9920</b>	0,9890	0,03134
		<i>Two-term</i>	a = 0,9978; b = 0,01392; c = 0,002228; d = -9,603	0,03688	0,9625	0,9484	0,06790
	55	<i>Diffusion Approach</i>	a = 5,844; b = 0,9222; k = 0,0242	0,1154	0,9414	0,9336	0,08772
		<i>Newton</i>	k = 0,03431	0,1121	0,9431	0,9431	0,08121
		<i>Page</i>	k = 0,02248; n = 1,149	0,1135	0,9424	0,9388	0,08422
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 1,011; k = 0,03556	0,1216	0,9383	0,9344	0,08717
		<i>Two-term exponential</i>	a = 1,661; k = 0,04805	0,1104	<b>0,9440</b>	0,9405	0,08308
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,039; b = -0,03299; k = 0,03338	0,1188	0,9397	0,9317	0,08899
		<i>Midilli</i>	a = 1; b = 0,002463; k = 8,446; n = 63,51	5,434	-1,757	-2,348	0,6230
		<i>Two-term</i>	a = 1,017; b = 0,03651; c = -5,33e-16; d = 0,3967	2,36e4	-1,20e4	-1,45e4	41,06

Tabela 7 (cont.)

Espécie	Temperaturas (°C)	Modelos	Parâmetros	SSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	RMSE
<i>Lactarius deliciosus</i>	35	<i>Diffusion Approach</i>	a = 0,02911; b = 0,01687; k = 1,983	0,06653	0,9546	0,9464	0,07777
		<i>Newton</i>	k = 0,04022	0,03061	0,9791	0,9791	0,04852
		<i>Page</i>	k = 0,07408; n = 0,8518	0,03117	0,9788	0,9770	0,05097
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 0,927; k = 0,03353	0,08897	0,9394	0,9343	0,08611
		<i>Two-term exponential</i>	a = 0,1485; k = 0,2601	0,03009	<b>0,9795</b>	0,9778	0,05007
		<i>Logarítmico</i>	a = 0,9052; b = 2,319e-9; k = 0,0314	0,09162	0,9375	0,9323	0,08738
		<i>Midilli</i>	a = 0,6198; b = 0,0001159; k = 1,502e-8; n = 4,816	0,05194	0,9646	0,9540	0,07207
		<i>Two-term</i>	a = 0,9048; b = 0,0313; c = -0,002109; d = -0,0251	0,09163	0,9375	0,9188	0,09572
	45	<i>Diffusion Approach</i>	a = 0,9839; b = 0,05713; k = 0,03727	0,02555	0,9763	0,9704	0,05651
		<i>Newton</i>	k = 0,03533	0,01835	<b>0,9830</b>	0,9830	0,04284
		<i>Page</i>	k = 0,03331; n = 1,026	0,02516	0,9767	0,9741	0,05288
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 1,009; k = 0,03625	0,02509	0,9768	0,9742	0,05280
		<i>Two-term exponential</i>	a = 0,6364; k = 0,04247	0,02354	0,9782	0,9758	0,05114
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,002; b = 0,01483; k = 0,03816	0,02362	0,9781	0,9726	0,05434
		<i>Midilli</i>	a = 1,006; b = 0,0002246; k = 0,02771; n = 1,096	0,02233	0,9793	0,9704	0,05648
		<i>Two-term</i>	a = 1,066; b = 0,03851; c = -0,06622; d = -9,235	0,03419	0,9683	0,9548	0,06988
	55	<i>Diffusion Approach</i>	a = 0,5735; b = 1; k = 0,1029	0,08002	0,9533	0,9466	0,07560
		<i>Newton</i>	k = 0,1062	0,05097	0,9703	0,9703	0,05644
		<i>Page</i>	k = 0,05795; n = 1,259	0,03822	0,9777	0,9762	0,05048
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 1,017; k = 0,1063	0,06727	0,9608	0,9581	0,06697
		<i>Two-term exponential</i>	a = 1,827; k = 0,1532	0,03763	<b>0,9780</b>	0,9766	0,05009
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,015; b = -0,001297; k = 0,1056	0,08407	0,9509	0,9439	0,07749
		<i>Midilli</i>	a = 0,6961; b = 0,0002224; k = 0,0002604; n = 3,087	0,06868	0,9599	0,9507	0,07269
		<i>Two-term</i>	a = 1,012; b = 0,1056; c = 0,0002944; d = 0,03582	0,09667	0,9436	0,9306	0,08624

Tabela 8 (cont.)

Espécie	Temperaturas (°C)	Modelos	Parâmetros	SSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado	RMSE
<i>Agaricus bisporus</i>	35	<i>Diffusion Approach</i>	a = 1,061; b = 0,2678; k = 0,1041	0,0118	0,9901	0,9883	0,03276
		<i>Newton</i>	k = 0,1278	0,002532	<b>0,9979</b>	0,9979	0,01396
		<i>Page</i>	k = 0,0001618; n = 2,966	0,007363	0,9938	0,9933	0,02477
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 1; k = 0,1279	0,007542	0,9937	0,9932	0,02507
		<i>Two-term exponential</i>	a = 1; k = 0,1279	0,007540	0,9937	0,9932	0,02507
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,004; b = -0,004241; k = 0,1268	0,01254	0,9895	0,9876	0,03376
		<i>Midilli</i>	a = 1,46; b = -2,799e-5; k = 0,0002586; n = 2,852	0,01685	0,9859	0,9816	0,04105
		<i>Two-term</i>	a = 1; b = 0,1281; c = 2,221e-14; d = 2,221e-14	0,01745	0,9854	0,9842	0,03814
	45	<i>Diffusion Approach</i>	a = -0,5182; b = 0,07604; k = 0,9796	0,02030	0,9812	0,9765	0,05037
		<i>Newton</i>	k = 0,06127	0,0002773	<b>0,9997</b>	0,9997	0,005266
		<i>Page</i>	k = 0,05921; n = 1,013	0,0005991	0,9994	0,9993	0,008159
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 1; k = 0,06137	0,0005082	0,9995	0,9994	0,007514
		<i>Two-term exponential</i>	a = 1,255; k = 0,06482	0,0005417	0,9995	0,9994	0,007758
		<i>Logarítmico</i>	a = 1,001; b = -0,0003115; k = 0,06157	0,0008141	0,9992	0,999	0,01009
		<i>Midilli</i>	a = 1,001; b = 1,644e-5; k = 0,05897; n = 1,026	0,001227	0,9988	0,9983	0,01324
		<i>Two-term</i>	a = 1,082; b = 0,06966; c = -0,08194; d = -19,53	0,001017	0,9990	0,9986	0,01206
	55	<i>Diffusion Approach</i>	a = 0,06928; b = 0,02096; k = 5,064	0,03362	<b>0,9753</b>	0,972	0,04734
		<i>Newton</i>	k = 0,1143	0,03522	0,9741	0,9741	0,05644
		<i>Page</i>	k = 0,1439; n = 0,9008	0,03390	0,9751	0,9735	0,04603
		<i>Henderson and Pabis</i>	a = 0,9883; k = 0,1128	0,03752	0,9724	0,9707	0,04843
		<i>Two-term exponential</i>	a = 0,1258; k = 0,8044	0,04253	0,9687	0,9667	0,05156
		<i>Logarítmico</i>	a = 0,9877; b = -1,814e-6; k = 0,1127	0,04268	0,9686	0,9644	0,05334
		<i>Midilli</i>	a = 1; b = 0,0003786; k = 9,687; n = 63,67	1,153	0,1517	-0,03012	0,2870
		<i>Two-term</i>	a = 0,776; b = 0,08929; c = -5,858e-16; d = 0,3966	111100	-8,18e4	-9,93e4	89,08

Na Figura 13 encontram-se representadas as velocidades de secagem em função do tempo, bem como as curvas obtidas após derivação das equações dos dois modelos anteriormente apresentados na Figura 12 e previamente expressos em termos de  $W$ .

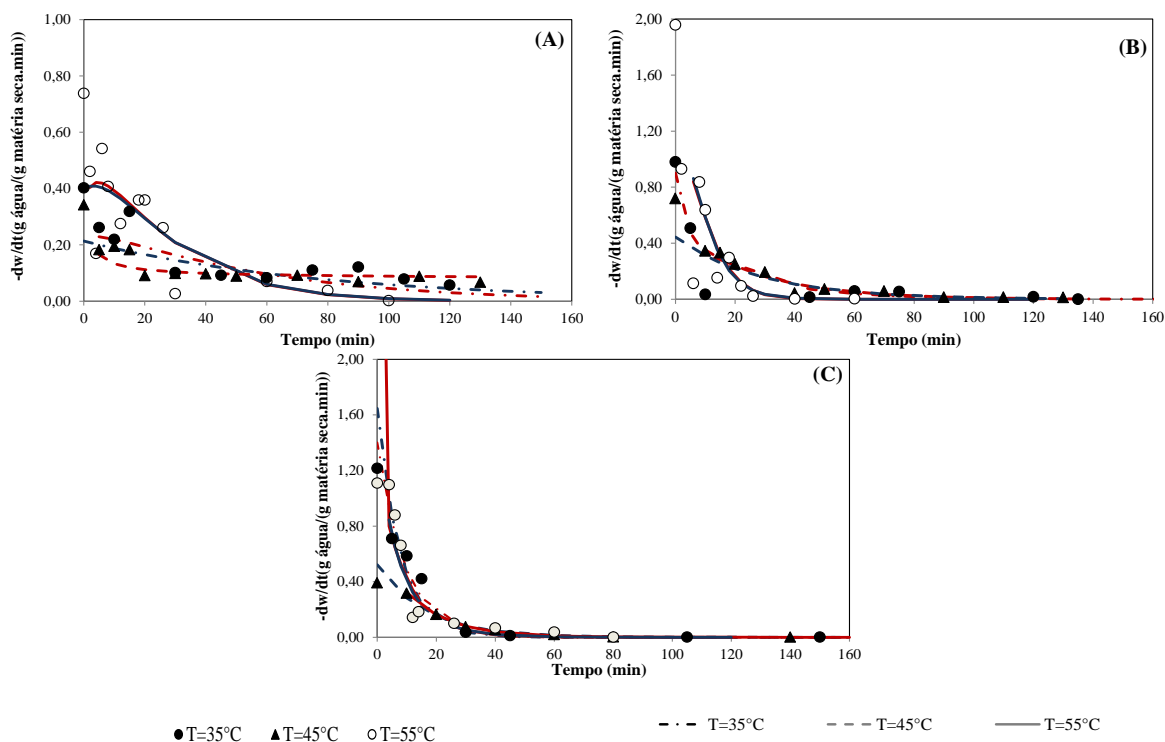


Fig. 13 - Velocidades de secagem em função do tempo para o (A) *S. luteus*, (B) *L. deliciosus*, e (C) *A. bisporus*.

Através das curvas de secagem obtidas verificaram-se unicamente períodos de velocidade decrescente, não se detetando períodos de velocidade constante. Novamente as maiores velocidades de secagem foram observadas para o *L. deliciosus* e *A. bisporus* (escala dos Y's até 2,0), indo de encontro aos resultados anteriormente apresentados.

Relativamente ao papel da temperatura de secagem, verificou-se que à temperatura mais elevada (55 °C), a velocidade de secagem foi maior no caso do *S. luteus* e do *L. deliciosus*. Em relação às outras duas temperaturas, os valores obtidos para a velocidade de secagem foram bastante semelhantes, sobrepondo-se na maioria das situações. Para o caso do *A. bisporus*, a diferença entre as temperaturas não foi tão acentuada, sendo as velocidades de secagem idênticas a 35, 45 e 55 °C.

Novamente se verificou que o *L. deliciosus* e o *A. bisporus* apresentaram comportamentos semelhantes, evidenciando uma perda acentuada de água no início da secagem, sendo a maioria da água perdida nos primeiros 30 minutos a 55 °C. Mais uma vez o *S. luteus*

apresentou um comportamento diferente e um pouco fora do vulgar, isto porque a perda de água não é tão acentuada nos primeiros minutos como se estaria à espera, demorando mais de 80 minutos a 55 °C para que a velocidade de secagem diminua significativamente e se obtenha um teor de água reduzido. Mais uma vez pode-se associar este facto, há existência da “película” que este cogumelo possui, funcionando como uma barreira à perda de água.

Os modelos determinados para representar as velocidades de secagem (Figura 13) apresentaram coeficientes de correlação mais baixos em relação aos obtidos para modelar as curvas de secagem representadas na Figura 12, com valores de  $R^2$  que variaram entre 0,614 e 0,998, para os dois melhores modelos determinados para cada um dos cogumelos às diferentes temperaturas. Isto seria de esperar, uma vez que as velocidades de secagem foram calculadas pelo método das derivadas finitas, um método de aproximação matemática com alguns erros associados. De referir que foi a espécie *S. luteus* que apresentou os valores de  $R^2$  mais baixos, tal como observado na Figura 13, na qual se pode detetar algumas diferenças entre os dados experimentais e os modelos determinados. Já no caso do *L. deliciosus* e *A. bisporus* se observaram bons ajustes entre as curvas determinadas e os pontos experimentais, indicando que os modelos anteriormente calculados representam bastante bem as velocidades de secagem experimentais determinadas.

A Figura 14 mostra as relações lineares encontradas entre o  $\ln mr$  e o tempo de secagem para cada uma das espécies de cogumelos, às temperaturas de 35, 45 e 55 °C. Utilizando o declive de cada uma das retas obtidas, foi possível calcular os valores das difusividades mássicas, usando a Equação 16.



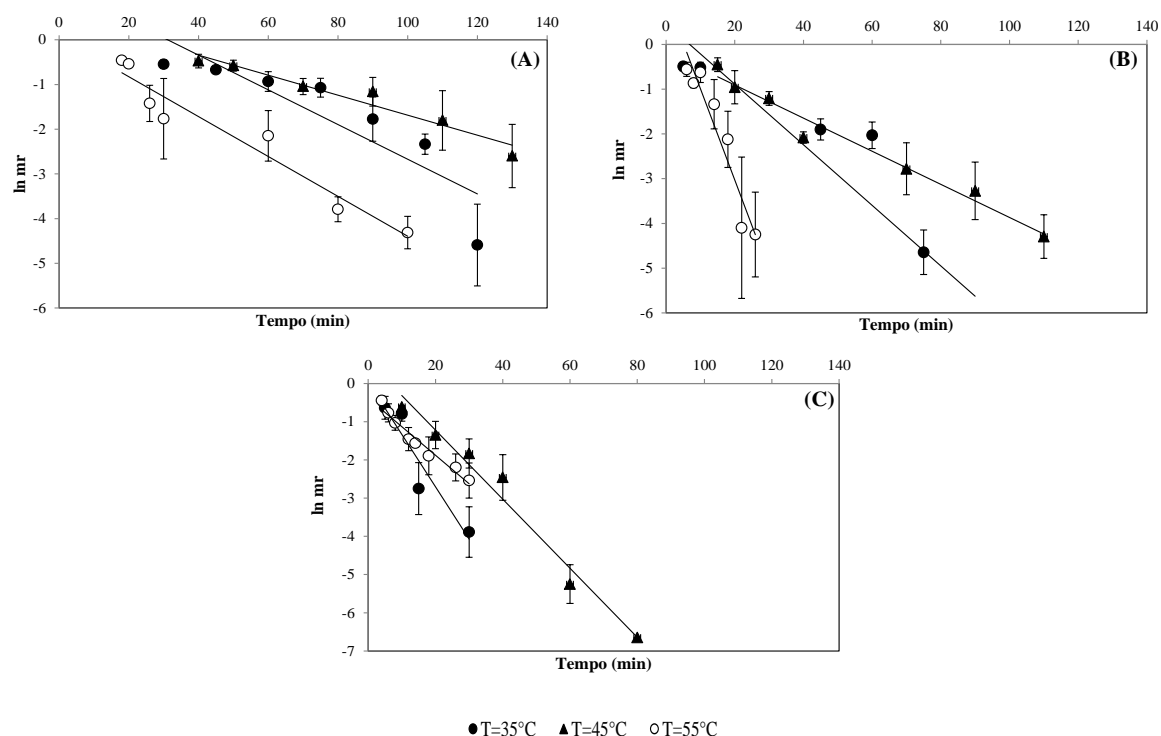


Fig. 14 -  $\ln mr$  em função do tempo de secagem para o (A) *S. luteus*, (B) *L. deliciosus* e (C) *A. bisporus*, às temperaturas de 35, 45 e 55 °C.

Tendo em conta os coeficientes de correlação linear ( $r$ ) obtidos (Tabela 7), os quais variaram entre 0,884 e 0,988, pôde-se constatar que a qualidade dos ajustes lineares determinados foi bastante boa. Desse modo, os valores de difusividade mássica determinados variaram entre  $2,02 \times 10^{-9}$  e  $3,31 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{min}$  ou  $3,37 \times 10^{-11}$  e  $5,52 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ . Estes valores estão de acordo com os referenciados na secagem de produtos alimentares, encontrando-se no intervalo de  $10^{-11}$  a  $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  (Maskan *et al.*, 2002).

Tabela 9 - Difusividades mássicas de vapor de água calculadas para as três espécies de cogumelos estudadas no presente trabalho e sujeitas a secagem por convecção com ar quente a 35, 45 e 55 °C.

Espécie	T (°C)	Declive ( $\text{min}^{-1}$ )	$r$	D ( $\text{m}^2/\text{min}$ )
<i>Lactarius deliciosus</i>	35	-0,0677	0,918	$1,10 \times 10^{-7}$
	45	-0,037	0,986	$6,00 \times 10^{-8}$
	55	-0,2038	0,957	$3,31 \times 10^{-7}$
<i>Agaricus bisporus</i>	35	-0,1369	0,941	$2,20 \times 10^{-7}$
	45	-0,0904	0,988	$1,47 \times 10^{-7}$
	55	-0,0747	0,977	$2,02 \times 10^{-9}$
<i>Suillus luteus</i>	35	-0,0388	0,884	$6,30 \times 10^{-8}$
	45	-0,0224	0,972	$3,64 \times 10^{-8}$
	55	-0,0446	0,969	$7,24 \times 10^{-8}$

Esperava-se observar um aumento da difusividade mássica com a temperatura. Contudo, nas três espécies de cogumelos estudadas tal comportamento não foi observado. Além disso, os valores de difusividade mássica determinados para o cogumelo de cultura (*A. bisporus*) foram semelhantes aos obtidos para os cogumelos silvestres.

### **3.5. Compostos voláteis**

Devido a não ter sido possível analisar os compostos voláteis presentes nos cogumelos frescos e desidratados analisados no presente trabalho, resultado da indisponibilidade do equipamento, só foi realizada a análise destes compostos em exemplares frescos das espécies *B. edulis* e *L. deliciosus*. A caracterização pormenorizada do perfil dos compostos voláteis, determinados nestas duas espécies de cogumelos em fresco, encontra-se indicada na Tabela 8. Nesta tabela também estão indicados os iões de quantificação (QI) e o método de identificação (ID), o qual foi envolvido a comparação com o composto padrão (S) ou através da livraria NIST 05 (MS).

Através da técnica de HS-SPME e GC/MS, foram extraídos e identificados, respetivamente, 33 compostos voláteis nas duas espécies de cogumelos. Os voláteis identificados pertencem a diferentes classes químicas. Foram assim determinados: 8 álcoois (1-8), 9 aldeídos (9-17), 2 ésteres (18-19), 3 cetonas (20-22), 4 sesquiterpenos (23-26) e 7 terpenos (27-33).

Tabela 10 - Perfil em compostos voláteis de duas espécies de cogumelos, *Boletus edulis* e *Lactarius deliciosus*, analisados em fresco no presente trabalho (média  $\pm$  desvio padrão; n=3).

Classes químicas	Compostos	TR (min)	QI (m/z) <sup>a</sup>	ID <sup>b</sup>	A/1000 ± SD <sup>c</sup>	
					<i>Boletus edulis</i>	<i>Lactarius deliciosus</i>
Álcoois						
1	3-Metil-1-butanol	3,746	55/70	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	86,8 ± 45,2
2	2-Metil-1-butanol	3,788	57/70	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	54,8 ± 21,2
3	1-Octen-3-ol	9,902	57	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	688,2 ± 296,0
4	3-Octanol	10,378	55/83	MS <sup>c</sup> (76,4/85,4)	5111,7 ± 116,3	2073,7 ± 382,4
5	(E)-2-Octen-1-ol	12,428	57/67/81	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	481,2 ± 103,2
6	1-Octanol	12,549	55/56/69	MS <sup>c</sup> (83,9/84,2)	n.d.	271,4 ± 72,8
7	(E)-2-Nonen-1-ol	13,608	51/70/82/95	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	29,0 ± 6,2
8	(E)-2-Decen-1-ol	16,356	41/43/55/57	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	46,7 ± 4,8	n.d.
Σ Álcoois					5158,4	3685,1
Aldeídos						
9	3-Metilbutanal	2,708	41/44/58	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	493,2 ± 24,5	167,9 ± 23,7
10	2-Metilbutanal	2,785	41/57/58	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	31,1 ± 8,4	44,6 ± 14,6
11	Hexanal	4,964	41/55/67/82	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	6,0 ± 1,4	32,2 ± 9,6
12	(Z)-2-Heptenal	9,175	55/69/83	MS <sup>c</sup> (79,1/86,5)	n.d.	48,9 ± 18,1
13	Benzaldeído	9,395	77/105	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	68,2 ± 7,8	98,4 ± 7,5
14	Octanal	10,581	41/57/69/81	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	1565,7 ± 680,4	252,2 ± 112,8
15	Fenilacetaldeído	11,853	91/120	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	2057,0 ± 376,7	n.d.
16	(E)-2-Octenal	12,121	41/55/70/83	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	1191,7 ± 182,3	853,7 ± 101,9
17	(Z)-4-Decenal	16,269	41/55/84	MS <sup>c</sup> (87,0/89,8)	19,6 ± 5,3	n.d.
Σ Aldeídos					5438,5	1497,9
Ésteres						
18	Octen-1-ol acetato	13,757	43/99	MS <sup>c</sup> (79,5/84,0)	599,2 ± 40,3	n.d.
19	3-Octanol acetato	14,012	43	MS <sup>c</sup> (73,2/83,8)	156,0 ± 51,1	n.d.
Σ Ésteres					755,2	-
Cetonas						
20	4-Metil-2-hexanona	7,198	43/58/71	MS <sup>c</sup> (68,5/81,0)	30,8 ± 9,1	n.d.
21	1-Octen-3-ona	9,757	55/70	MS <sup>c</sup> (75,5/81,1)	2639,0 ± 379,1	n.d.
22	3-Octanona	10,105	43/99	MS <sup>c</sup> (76,0/86,0)	n.d.	10384,3 ± 1350,5
Σ Cetonas					2669,8	10384,3
Sesquiterpenos						
23	Composto 1	21,664	67/81/93	MS <sup>c</sup> (85,8/86,5)	n.d.	529,8 ± 145,4
24	Composto 2	24,256	93/105/161	MS <sup>c</sup> (82,9/86,3)	n.d.	93,2 ± 25,8
25	Composto 3	24,422	91/105/189	MS <sup>c</sup> (82,2/87,5)	n.d.	101,0 ± 57,8
26	Composto 4	24,704	67/93/105/119	MS <sup>c</sup> (80,2/81,7)	n.d.	104,3 ± 35,2
Σ Sesquiterpenos					n.d.	828,3
Terpenos						
27	1R-α-Pineno	8,449	93	MS <sup>c</sup> (78,2/87,5)	35,7 ± 1,7	n.d.
28	α-Felandreno	10,656	77/93	MS <sup>c</sup> (81,7/86,6)	n.d.	283,9 ± 47,2
29	o-Cimeno	11,213	91/119/134	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	155,6 ± 34,7	285,5 ± 51,7
30	Limoneno	11,351	67/93	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	150,2 ± 23,7	549,1 ± 30,7
31	L-Fenchone	13,233	69/81	MS <sup>c</sup> (84,5/86,8)	810,9 ± 65,5	n.d.
32	Linalol	13,463	55/71/93/121	S <sup>d</sup> /MS <sup>c</sup>	n.d.	193,2 ± 65,5
33	(E)-Óxido de limoneno	14,660	79/93/108	MS <sup>c</sup> (77,7/83,2)	66,2 ± 9,7	n.d.
Σ Terpenos					1218,5	1311,7

n.d. – não detetado; TR – tempo de retenção;

<sup>a</sup> Iões de quantificação;

<sup>b</sup> Método de identificação;

<sup>c</sup> Tentativa de identificação através da livreria NIST 05 (valores de fit/retrofit, %);

<sup>d</sup> Identificação por comparação com composto padrão;

<sup>e</sup> Áreas expressas em unidades arbitrárias.

Na Figura 15 encontram-se representados dois cromatogramas determinados para ambas as espécies de cogumelos, onde se detetam diferenças significativas entre elas.

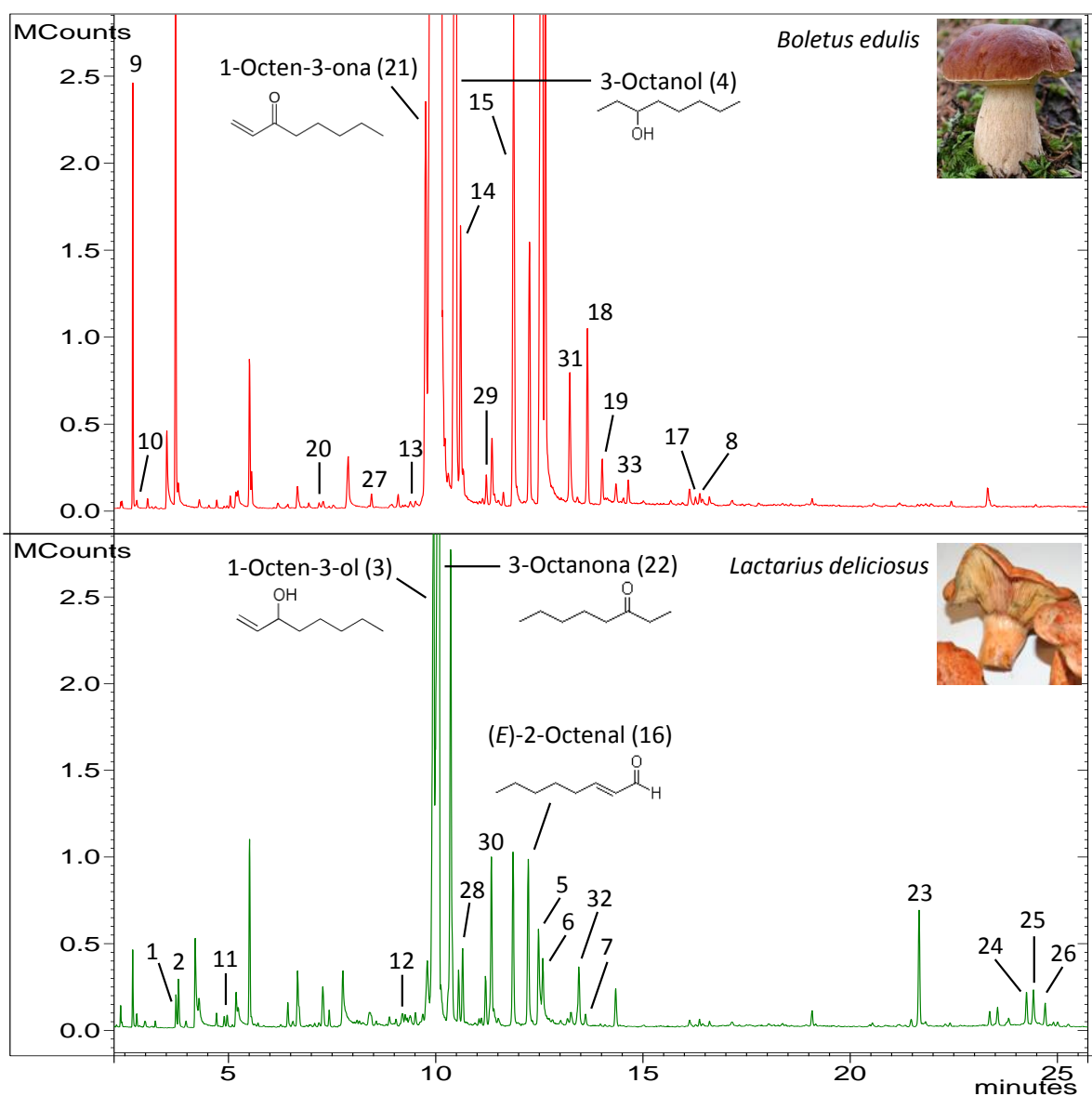


Fig. 15 - Perfil cromatográfico obtido a partir das duas espécies de cogumelos silvestres analisadas por HS-SPME utilizando fibra divinilbenzeno/PDMS e GC/MS (os números de identificação correspondem aos compostos apresentados na Tabela 8).

O perfil aromático destas duas espécies de cogumelos revelou variabilidade, tanto nas frações qualitativas como quantitativas (Figura 16), tendo sido identificados um maior número de compostos volatéis no *L. deliciosus* (23) do que no *B. edulis* (19).

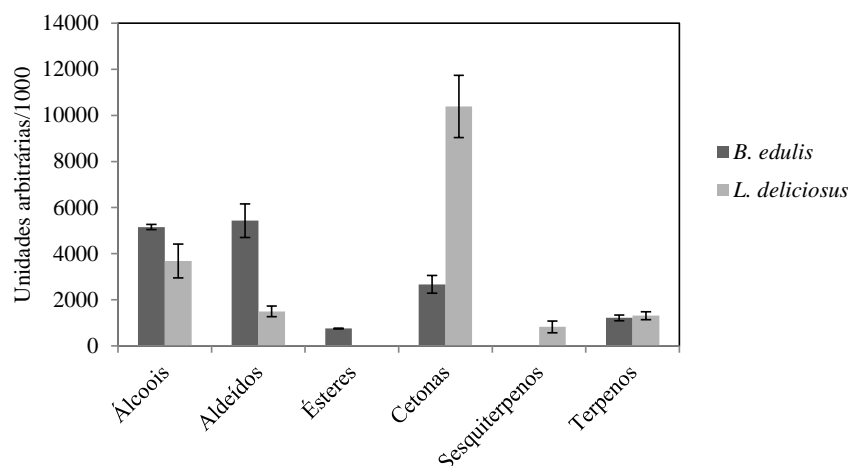


Fig. 16 - Soma das áreas (unidades arbitrárias/1000) das diferentes classes químicas identificadas (Álcoolis, Aldeídos, Ésteres, Cetonas; Sesquiterpenos e Terpenos) nas duas espécies de cogumelos silvestres.

Compostos alifáticos com oito átomos de carbono, tais como o 3-octanol e 3-octanona, foram os compostos voláteis mais abundantes, identificados no *B. edulis* e no *L. deliciosus*, respetivamente. Este resultado foi idêntico ao observado num trabalho que caracterizou o perfil volátil de *C. odora* por diferentes técnicas de extração (Rapier *et al.*, 2002), onde se verificou ser o composto 3-octanol um dos mais abundantes. Estes compostos são conhecidos por se formar através de reações enzimáticas em que os ácidos gordos, como o linoleico e o linolénico estão envolvidos (Matsui *et al.*, 2003; Combet *et al.*, 2006; Combet *et al.*, 2009). Verificou-se ainda que as classes químicas mais abundantes no *B. edulis* foram os álcoolis e os aldeídos. No *L. deliciosus*, apesar dos álcoolis se terem destacado mais uma vez, foram as cetonas que apareceram com maior expressão.

São principalmente os álcoolis e as cetonas, compostos alifáticos C8, tais como 3-octanol, 2-octen-1-ol, 1-octanol e 3-octanona, os principais compostos responsáveis pelo aroma característico a cogumelo (Cho *et al.*, 2008, Pinho *et al.*, 2008), exalado pelas espécies estudadas no presente trabalho.

Os aldeídos foram também uma classe química bastante representativa com 9 compostos identificados (compostos 9-17 indicados na Tabela 8). Alguns destes compostos transmitem aromas a gordura, tais como o hexanal e o octanal. O benzaldeído, identificado nas duas espécies de cogumelos, já avaliado em muitas análises sensoriais, está associado à amêndoa amarga (Jong & Birmingham, 1993; Misharina *et al.*, 2009; Ouzouni *et al.*, 2009), encontrando-se em maior quantidade no *L. deliciosus*.

Em relação aos sesquiterpenos são conhecidos por contribuir com um odor a óleo de madeira de cedro em algumas espécies de cogumelos (Ouzouni *et al.*, 2009). Apenas foram quantificados sesquiterpenos no *L. deliciosus*, mas não se conseguiu proceder à sua identificação. Os sesquiterpenos possuem ainda interessantes propriedades bioativas e biológicas, tais como, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, entre outras (Abraham, 2001; Kramer & Abraham, 2012), todas características de grande importância, daí serem usados na indústria farmacêutica e ainda no processamento de produtos alimentares.

Os terpenos foram identificados em quantidades consideráveis nas duas espécies de cogumelos. O L-fenchone e o Limoneno foram os terpenos mais abundantes no *B. edulis* e no *L. deliciosus*, respetivamente. Ambos têm odores característicos de citrinos e a ervas (Breheret *et al.*, 1997; Ouzouni *et al.*, 2009).

Em estudos anteriormente publicados o uso de ferramentas quimiométricas demonstrou ser adequado para discriminar cogumelos numa vasta gama de parâmetros, tais como: discriminação por espécies (Yang & Ele, 2008a, 2008b; Yang *et al.*, 2008); origem geográfica (Lee *et al.*, 2006; Liu & He, 2011; Lim *et al.*, 2012); graus de maturação (Cho *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007); caracterização sensorial (Leguijt *et al.*, 1996; Pinho *et al.*, 2008).

Usando a quimiometria, através de PCA, foi possível obter o perfil volátil das duas espécies de cogumelos em estudo. Na Figura 17 encontram-se os resultados obtidos, onde os compostos químicos foram agrupados por classes químicas.

A partir da análise da PCA foi possível distinguir as duas espécies de cogumelos através das classes químicas. Os dois componentes principais obtidos explicam 87,2% da variância total dos dados usados. A primeira componente (67,2%) é formada pelos grupos aldeído, éster, álcool e cetona. A segunda componente (20,0%) é formada pelos grupos terpeno e sesquiterpeno.

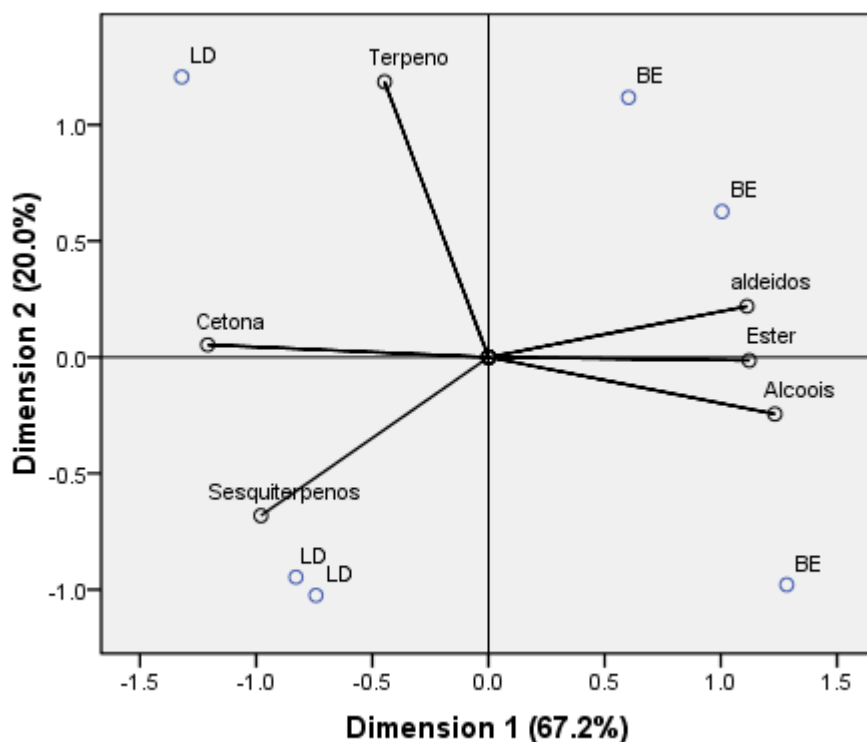


Fig. 17 - Análise das componentes principais obtidas a partir dos dados do perfil de voláteis (classes químicas) determinados por HS-SPME e GC/MS das duas espécies de cogumelos silvestres. Os fatores PCA explicam 87,2% da variância total.

Verificou-se que o *L. deliciosus* se encontra mais representado na região negativa, sendo os terpenos, cetonas e os sesquiterpenos as classes químicas mais representativas. Em relação ao *B. edulis*, são os aldeídos, ésteres e álcoois as classes químicas mais representativas. Este último cogumelo encontra-se mais representado na parte positiva.

No presente trabalho também se pretendeu estudar o efeito da secagem sobre os voláteis em cogumelos. Contudo, não foi possível determiná-los nos cogumelos estudados e, por isso, compararam-se os resultados obtidos com os publicados para *B. edulis* secos em estufa, analisados pela equipa de trabalho responsável pela análise destes compostos. Os resultados obtidos para os voláteis do *B. edulis* secos encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 11 - Perfil dos compostos voláteis de *Boletus edulis* desidratado (Fonte: Pinho *et al.*, 2008).

Classes químicas	Compostos	Amostra % relativa	QI (m/z) <sup>a</sup>
<b>Álcoois</b>			
1	1-Hexanol	77,9	56
2	1-Octen-3-ol	31	57/99
3	2-Nonen-1-ol	10,2	57/67/82/95
4	Álcool furfural	100	98
4	2-Feniletanol	18,4	91
<b>Aldeídos</b>			
5	Hexanal	77,9	56
6	Metional	100	76/104
7	Benzaldeído	11,5	105
8	Fenilacetaldeído	2,2	91
9	Undecanal	12,9	57/82/96
<b>Cetonas</b>			
10	1-Octen-3-ona	8,9	55/97
<b>Terpenos</b>			
11	α-Pineno	11,2	93
12	o-Cimeno	10,6	119
13	Limoneno	2,6	67
14	Eucaliptol	29,3	93
15	Linalol	1	93
16	Mentol	31	81

<sup>a</sup>Tões de quantificação;

Os compostos que se encontram em maior quantidade, designadamente o álcool furfural e o metional, podem transmitir aromas a queimado, facto esperado já que estes cogumelos foram desidratados em estufa. Verificou-se que o tratamento térmico induziu a formação de alguns álcoois (1-octen-3-ol e 2-nonen-1-ol), aldeídos (metional e undecanal) e terpenos (eucaliptol, linalol e mentol), compostos não detetados nos exemplares frescos de *B. edulis*. Em relação aos compostos maioritários determinados nestes cogumelos, designadamente o 3-octanol e o octanal, verificou-se que o tratamento térmico causou a perda destes compostos, uma vez que não foram detetados nos cogumelos secos. Em relação ao fenilacetaldeído e 1-octen-3-ona, o seu teor baixou com a desidratação. Desse modo, concluiu-se que o tratamento térmico pode induzir alterações no perfil dos compostos voláteis presentes nos cogumelos.



## ***Capítulo IV***

*Conclusões finais*

Após a realização deste trabalho verificou-se que o processo de secagem afetou as propriedades biológicas e fração volátil das espécies de cogumelos estudadas.

Ao avaliar a atividade antioxidante das diversas espécies de cogumelos comestíveis (silvestres e de cultura) analisadas, em fresco e secas, verificou-se que os cogumelos desidratados forneceram melhores resultados. Os cogumelos secos, para além de apresentarem uma maior capacidade redutora total, demonstraram um efeito bloqueador de radicais livres de DPPH e poder redutor mais elevados do que os frescos. Em relação aos cogumelos estudados, os silvestres não se evidenciaram face ao de cultura.

Relativamente à fração volátil, 33 diferentes compostos foram identificados nos cogumelos frescos de *L. deliciosus* e *B. edulis*, pertencentes a 6 grupos químicos. Os compostos maioritários foram o 3-octanol e 3-octanona, que transmitem aromas muito característicos dos cogumelos. Além disso, as duas espécies conseguem-se distinguir tendo em conta o perfil de voláteis. Contudo, os compostos voláteis podem alterar-se com o processo de secagem.

Já em relação ao processo de secagem, este trabalho permitiu concluir que o *L. deliciosus* e *A. bisporus* apresentaram comportamentos semelhantes quando sujeitos às mesmas condições. Pelo contrário, o *S. luteus* diferenciou-se das outras duas espécies. Na verdade, o último cogumelo apresenta uma película que poderá influenciar em certa medida o processo de secagem. No presente trabalho, e tal como era esperado, o uso de temperaturas mais elevadas permite taxas de secagem mais rápidas, resultando num processo de secagem mais rápido, logo economicamente mais viável. Os modelos empíricos estudados apresentaram bons ajustes, destacando-se o de Newton e o *Two-term exponential*. As difusividades mássicas determinadas variaram entre  $3,37 \times 10^{-11}$  e  $5,52 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s. Mais uma vez os cogumelos silvestres não se evidenciaram em relação ao de cultura.

## ***Capítulo V***

### ***Referências bibliográficas***

Abraham, W.R. (2001). Bioactive sesquiterpenes produced from fungi: are they useful for humans as well. *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 583-606.

Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N. & Papageorgiou, V.P. (2002). Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytotherapy Research*, **17**, 501-507.

Argyropoulos, D., Heindl, A. & Müller J. (2011). Assessment of convection, hot-air combined with microwave-vacuum and freeze-drying methods for mushrooms with regard to product quality. *International Journal of Food Science & Technology*, **46**, 333–342.

Baptista, P.C.S. (2007). Macrofungos associados à cultura de castanheiro: aspectos da sua biodiversidade e da interacção de *Pisolithus tinctorius* e *Hypholoma fasciculare* com raízes de *Castanea sativa* Mill. Tese de Doutorado: Escola de Ciências, Universidade do Minho.

Baptista, P., Branco, & Martins, A. (2003). Preliminary evaluation of edible mushroom biodiversity and production in the Northeast of Portugal. *3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms: Ecology, Physiology and Cultivation*. Victoria (Canada).

Baptista, P., Martins, A., Tavares, R.M. & Lino-Neto, T. (2010). Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast of Portugal). *Fungal Ecology*, **3**, 9-19.

Barros, L., Ferreira, I.C, & Baptista, P. (2008). "Phenolics and antioxidant activity of the mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium at different carbon sources. *Food Science and Technology International*, **14**, 47 - 55.

Beltran-García, M.J., Espinosa-Estarron, M., & Ogura, T. (1997). Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4049-4052.

Berger RG, Neuhauser K, & Drawert F. (1986). Characterization of the odour principles of some basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. *Flavour and Fragrance Journal*. **1**, 181-185.

Berker, K.I., Güclü, K., Tor, I. & Apak, R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, **72**, 1157–1165.

Blanco D., Venturini M<sup>a</sup>.E., Marco P., Rivera C.S. (2011). Comercialización de los hongos silvestres comestibles. In Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y Leon, Fernando Martínez-Peña,. Juan Andrés Oria de Rueda, Teresa Ágreda (Ed.), Somacyl- Junta de Castilla y León, 230-269

Breheret, S., Talou, T., Rapior, S. & Bessière, J-M. (1997). Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 831-836

Brod, F.R. (2003). Avaliação de um Secador Vibro-Fluidizado. Tese de dissertação FEAGRI/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Burton, K.S. & Twynning, R.I. (1989). Extending mushroom storage-life by combining modified atmosphere packaging and cooling. *Acta Horticulturae*, **258**, 565-571.

Çaglarirmak, N. (2007). The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*, **105**, 1188-1194.

Çelen S., Kahveci, K., Akyol, U. & Haksever, A. (2010). Drying behaviour of cultured mushrooms. *Journal of Food Processing and Preservation*, **34**, 27-42.

Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D.C. & Burton, K.S. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, **47**, 317-326.

Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D.C. & Burton, K.S. (2009). Influence of sporophore development, damage, storage, and tissue specificity on the enzymatic formation of volatiles in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 3709-3717.

Courtecuisse, R. (1999). *Mushrooms of Britain and Europe*. London: HarperCollins Publishers.

Courtecuisse, R., & Duhem, B. (2005). *Guía de los hongos de la Península Ibérica, Europa y Norte de África*. Barcelona: Ediciones Omega.

Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, **54**, S91-S93.

Cheung L.M., Cheung P.C.K. & Ooi E.C.V. (2003). Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts, *Food Chemistry* **81**, 249-255.

Cheung, L.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, **89**, 403-409.

Cho, I.H., Choi, H.K., & Kim, Y.S. (2006). Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) according to their grades. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4820-4825.

Cho, I.H., Kim, Y-S., & Choi, H.K. (2007). Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using <sup>1</sup>H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**, 900-904.

Cho, I.H., Namgung, H.J., Choi, H.K. & Kim, Y.S. (2008). Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry*, **106**, 71-76.

Coutinho, L.N., (2004) Cultivo de Espécies de Cogumelo Comestíveis. Disponível em: <<http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>>.

Delgado, T., Malheiro, R., Pereira, J.A. & Ramalhosa, E. (2010). Hazelnut (*Corylus avellana* L.) kernels as a source of antioxidants and their potential in relation to other nuts. *Industrial Crops and Products*, **32**, 621-626.

Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-willi, G., Kok, F.J., Rice-Evan, C. & Roberfroid, M. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, **80S**, S77–S112.

Duh P.D., Tu Y.Y. & Yen G.C. (1999). Antioxidant activity of water extract of harn jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, **32**, 269-277.

Ferreira, I.C., Barros, L., Abreu & R.M. (2009). Antioxidants in wild mushroom, *Current Medicinal Chemistry*, **1**, 1543-1560.

Fortes. M. & Okos, M P. (1980). Drying Theories: Their Bases and Limitations as Applied to Foods and Grians, *Advances in Drying*, **1**, 119-153.

Fukushima, N.S., & Tsuda, H. (1985). Carcinogenity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*, **15**, 109–150.

Garcia M, Carvalheira M, Azevedo J. (2006). Contribuição para a caracterização da recolha comercial de macrofungos comestíveis no distrito de Bragança, Portugal. In: Anais da Associação Micológica "A Pantorra": Os Cogumelos e a Criança. **6**, 141-153.

Giri , S.K. & Prasad, S. (2007). Drying kinetics and rehydration characteristics of microwave-vacuum and convective hot-air dried mushrooms. *Journal of Food Engineering*. **78**, 512–521.

Guiné, R.F.G. & Fernandes R.M.C. (2006). Analysis of the drying kinetics of chestnuts, *Journal of Food Engineering*, **76**, 460-467.

Gormley, R. (1975). Chill storage of mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 401-411.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, **16**, 33–50.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine. United Kingdom: Oxford University Press.

Hongfang, J., Ailin, D., Lingwen, Z., Shuang, L., Mingduo, Y. & Bo L. (2012). Effects of Drying Methods on Antioxidant Properties and Phenolic Content in White Button Mushroom. *International Journal of Food Engineering*, **8**, 1556-3758.

Hu, F.B. (2000). Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Current Opinion in Lipidology*, **13**, 3–9.

ICN (Cord). 2001. Conservação, valorização e comercialização de cogumelos silvestres. Documento interno, não publicado (Centro de Investigação de Montanha (CIMO) e Departamento Florestal, Escola Superior Agrária de Bragança, Apartado 172, 5301-854 Bragança, Portugal)

- Ji, H., Du, A., Zhang, L., Li, S., Yang, M. & Li, B. (2012). Effects of Drying Methods on Antioxidant Properties and Phenolic Content in White Button Mushroom. *International Journal of Food Engineering*, **8**, 1556-3758.
- Jong, S.C., & Birmingham, J.M. (1993). Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds. In: S-T. Chang, J.A. Buswell, S-W. Chiu (Eds), *Mushroom biology and mushroom products: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference* 345-366. Chinese University Press.
- Kader, A.A.; Zagory, D. & Kerbel, E.L. (1989). Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **28**, 1-30.
- Kirk P., Cannon P., David J. & Stalpers J. (2001). Ainsworth & Bisby's *Dictionary of the Fungi*: CABI Bioscience.
- Kulshreshtha, M., Singh A., Deepti & Vilpul (2009). Effect of drying conditions on mushroom quality. *Journal of Engineering Science and Technology*, **4**, 90–98
- Kramer, R. & Abraham, W-R. (2012). Volatile sesquiterpenes from fungi: what are they good for. *Phytochemistry Reviews*, **11**, 15-37.
- Lee, N.Y., Bae, H.R., & Noh, B.S. (2006). Discrimination of geographical origin of mushroom (*Tricholoma matsutake*) using Near Infrared Spectroscopy. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **38**, 835-837.
- Lee, N.Y., Bae, H.R., Lim, C.L., & Noh, B.S. (2006). Discrimination of geographical origin of mushroom (*Tricholoma matsutake*) using electronic nose based on mass spectrometry. *Food Engineering Progress*, **10**, 275-279.
- Lim, J.M., Lee, J.H., Sun, G.M., Moon, J.H., Chung, Y.S., & Kim, K.H. (2012). The geographical origin and chemical composition in phellinus mushrooms measured by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **291**, 451-455.
- Liu, F., & He, Y. (2011). Discrimination of producing areas of *Auricularia auricula* using visible/near infrared spectroscopy. *Food and Bioprocess Technology*, **4**, 387-394.
- Lo, K.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, **89**, 533–539.
- Luccas, V. (1996). *Obtenção de Fatias de Banana Desidratada Através da Pré-Secagem a Altas Temperaturas e Curto Tempo em Leito Fluidizado*. Dissertação de M.Sc., FEQ/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- Malheiro, R., Pinho, P.G., Casal, S., Bento, A. & Pereira, J. (2011). Determination of the volatile profile of stoned table olives from different varieties by using HS-SPME and GC/IT-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **91**, 1693-1701.
- Matsui, K., Sasahara, S., Akakabe, Y. & Kajiwarra, T. (2003). Linoleic acid 10-hydroperoxide as intermediate during formation of 1-octen-3-ol from linoleic acid in *Lentinus decadetes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **67**, 2280-2282.

- Ma, L., Chen, H., Zhu, W. & Wang, Z. (2011). Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Research International*. doi :10.1016 / j.foodres.2011.05.005.
- Mau, J.L., Chyau, C-C., Li, J-Y., & Tseng, Y-H. (1997). Flavor compounds in straw mushrooms *Volvariella volvacea* harvested at diferente stages of maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4726-4729.
- Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J. & Chen, C.C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, **87**, 111–118.
- Menon, A.S. & Mujumdar, A.S. (1987). Drying of Solids: Principles, Classification, and Selection of Dryers. Handbook of Industrial Drying. New York: Marcel Dekker Inc., **9**, 295-326.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, J.M. & Lema, M.J. (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3890-3897.
- Muyanja, C., Kyambadde, D. & Namugumya, B. (2012). Effect of Pretreatments and Drying Methods on Chemical Composition and Sensory Evaluation of Oyster Mushroom (*Pluerotus Oestreatus*) Powder and Soup. *Journal of Food Processing and Preservation*. doi: 10.1111/j.1745-4549.2012.00794.x
- Naik, S., Ramachandra, M., Rajashekharappa, K.S., Tulasidas, T.N., Murali, K. & Mallesha, B.C. (2006). Drying of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) in different dryers. *J. Dairying, Foods & H.S.* **25**, 79-86.
- Nogueira L., Malheiro R., Pinho P.G. & Baptista P. (2010). Volatile composition of three species of wild mushrooms from Trás-os-Montes region using HS-SPME and GC/IT-MS. *XVI Encontro Luso-Galego de Química, Aveiro*.
- Noël-Suberville, C., Cruz, C., Guinberteau, J. & Montury, M. (1996). Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh blewit (*Lepista nuda*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1180-1183.
- Oliveira, I., Sousa, A., Sá Morais, J., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L.M. & Pereira, J.A. (2008). Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem.Toxicol.* **46**, 1801–1807.
- Oliveira I., Pinho P.G., Malheiro R., Baptista P. & Pereira, J.A. (2011). Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. *Food Chemistry*, **128**, 667-673.
- Ordóñez, J.A., et al.(2005). Tecnología de lo alimentos, Volume I, Componentes de los alimentos y procesos, Artmed, (ed.) Madrid, Eapanhã.
- Ouzouni, P.K., Koller, W.D., Badeka, A.V. & Riganakos, K.A. (2009). Volatile compounds from the fruiting bodies of three *Hygrophorus* mushroom species from Northern Greece. *International Journal of Food Science & Technology*, **44**, 854-859.



- Maskan A., Kaya S. & Maskan M. (2002). Hot air and sun drying of grape leather (pestil). *Journal of Food Engineering*, **54**, 81-88.
- Misharina, T.A., Muhutdinova, S.M., Zharikova, G.G., Terenina, M.B. & Krikunova, N.I. (2009). The composition of volatile components of cepe (*Boletus edulis*) and Oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **45**, 187-193.
- Park, K.J. (1988). Fundamentos de Secagem. Notas de aula. Faculdade de Engenharia Agrícola– UNICAMP.
- Park, K.J., Tuboni, C.T., Oliveira, R.A., *et al.*, (2004). Estudo da Secagem de Caqui com Encolhimento e sem Encolhimento, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande-PB, **6**, 71-86.
- Pinho P.G, Ribeiro B, Gonçalves R.F, Baptista P, Valentão P, Seabra R.M, *et al.*, (2008) Correlation between the Pattern Volatiles and the Overall Aroma of Wild Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1704-12.
- Poppe, J. (2000). Use of agricultural waste materials in the cultivation of mushrooms. *Mushroom Science* **15**, 1: 3-19
- Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. & Kawakishi, S. (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 75-82.
- Raprior, S., Breheret, S., Talou, T., Péliissier, Y. & Bessi re, J-M. (2002). The anise-like odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia*, **94**, 373-376.
- Rezagah, M.E., Kashaninejad, M., Mirzaei, H. & Khomeiri, M. (2010). Osmotic dehydration of button mushroom: Fickian diffusion in slab configuration. *Lat. Am. appl. res*, **40**, 23-26.
- Ribeiro Br., Andrade P., Silva M., Baptista P., Seabra M. & Valent o Pc. (2008). Comparative Study on Free Amino Acid Composition of Wild Edible Mushroom Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 10973-10979.
- Sadler M., 2003. Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin*, **28**, 305-308.
- Saija, A. & Ucella, N. (2001). Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trend in Food and Science and Technology*, **11**, 357-363.
- Singh, G.D., Sharma, R., Bawa, A.S. & Saxena, D.C. (2008). Drying and rehydration characteristics of water chestnut (*Trapa natans*) as a function of drying air temperature. *Journal of Food Engineering*, **87**, 213-221.
- Singleton, V.L. & Rossi, Jr.J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. *J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- Soler-Rivas, C., Esp n, J.C. & Wichers, H.J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1013-1023.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **40**, 945–948.

- Shivhare, U.S., Arora, S., Ahmed, J. & Raghavan, G.S.V. (2004). Moisture adsorption isotherms for mushroom, *Lebensm. Wiss. u. Technol*, **37**, 133-137.
- Shukla, B.D. & Singh, S.P. (2007). Osmo-convective drying of cauliflower, mushroom and greenpea. *Journal of Food Engineering*, **80**, 741-747.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simoncic, M., & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **89**, 91–198.
- Smith J.E, Rowan N. & Sullivan R. (2002). Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. London: Cancer Research UK.
- Stone, W.L., Leclair, I., Ponder, T., Baggs, G., & Barrett-Reis, B. (2003). Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*. **77**, 899–906.
- Tanaka, Kuei CW, Nagashima Y, Taguchi T. (1998). Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. *Nippon Suisan Gakkaishil*, **54**, 1409-1414.
- Travaglini, D.A., Neto, M.P., Bleinroth, E.W., *et al.*, (1993). Banana-Passa: Princípios de Secagem, conservação e produção industrial. Campinas, SP: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 73. (Manual Técnico no 12).
- Tsai S.-Y., Huang S.-J., Lo S.-H., Wu T.-P., Lian P.-Y. & Mau J.-L. (2009). Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, **113**, 578-584.
- Vaz, J.A., Heleno S.A., Martins, A., Almeida, G.M., Vasconcelos, M.H. & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2881-2884.
- Visioli, F., Poly, A. & Galli, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of polyphenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, **22**, 65-75.
- Wakchaure G.C., Manikandan K, Mani Indra & Shirur M., (2010). Kinetics of Thin Layer Drying of Button Mushroom. *Journal of Agricultural Engineering*, **47**, 41-46.
- Wang Y & Hall I.R., (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany*, **82**, 1063-73.
- Walde, S.G., Velu, V., Jyothirmayi T. & Math R.G. (2006). Effects of pretreatments and drying methods on dehydration of mushroom. *Journal of Food Engineering*, **74**, 108-115.
- Xanthopoulos, G., Yanniotis, S. & Lambrinos, Gr. (2010). Study of the drying behaviour in peeled and unpeeled whole figs. *Journal of Food Engineering*, **97**, 419-424.
- Yang, J.H., Lin, H.C., & Mau, J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, **77**, 229–235.

- Yang, H., & He, Y. (2008a). Nondestructive variety discrimination of fragrant mushrooms based on Vis/NIR spectral analysis. In: D. Li, & G. Deng (Eds.), *Proceedings of the International Congress on Image and Signal Processing*, 64-67. Washington: IEEE Computer Society Press.
- Yang, H., & He, Y. (2008b). Design and implement of variety discriminator of fragrant mushrooms based on Vis/NIR spectroscopy and BP-ANN. In: *Proceedings of the International Conference on Automation and Logistics*, 2727-2730.
- Yang, H, Wu, J., Chen, X., & He, Y. (2008). A new study on variety discrimination of fragrant mushrooms using genetic algorithm. In: *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress on Intelligent Control and Automation*, 8706-8710.
- Yen, G.C., & Hung, C.Y. (2000). Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsiantiao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Research International*, **33**, 487–492.
- Y. Tulek, (2011). Drying Kinetics of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in a Convective Hot Air Dryer. *Journal. Agricultural Science Technology*, **13**, 655-664.
- Yun, W. & Hall IR. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany. Journal Canadien de Botanique* **82**, 1063-1073.